

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevas modificaciones lipídicas implicadas en autofagia:  
papel en la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Ángel Gaudioso Guirado**

**Director**

**José Antonio Rodríguez Navarro**

**Madrid**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Químicas**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Nuevas modificaciones lipídicas implicadas en autofagia.  
Papel en la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**D. Ángel Gaudioso Guirado**

Director de la Tesis:

**D. José Antonio Rodríguez Navarro**

**Madrid, 2019**





UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Ángel Gaudioso Guirado,  
estudiante en el Programa de Doctorado Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina,  
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

"Nuevas modificaciones lipídicas implicadas en autofagia. Papel en la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento"

y dirigida por: José Antonio Rodríguez Navarro

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 27 de mayo de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.





**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Químicas**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Nuevas modificaciones lipídicas implicadas en autofagia.**

**Papel en la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento**

Memoria presentada por Ángel Gaudioso Guirado para optar al  
grado de doctor

Director de la Tesis: José Antonio Rodríguez Navarro

Tutor de la Tesis: Guillermo Velasco Díez

Vº Bº Director

José Antonio Rodríguez Navarro

Vº Bº Tutor

Guillermo Velasco Díez



El presente trabajo ha sido realizado en el Servicio de Neurobiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

El presente trabajo ha sido financiado mediante un contrato de investigación predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (BES-2014-068034).

La estancia de tres meses fue financiada mediante una ayuda a la movilidad predoctoral del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (EEBB-I-2018-12893).

La financiación para el desarrollo del presente trabajo ha sido proporcionada por los siguientes proyectos:

- SAF2013-45570-R
- CP13/00234
- SAF2016-78666-R



## Agradecimientos

Hace ya cuatro años y medio que empezó esta aventura y muchas cosas han pasado desde entonces. He aprendido mucho durante este tiempo y puedo decir con orgullo que soy mejor investigador hoy de lo que era cuando empecé en el laboratorio en septiembre de 2014. Pero no solo eso, en el terreno personal estos años han sido inolvidables y me han convertido en una persona mejor. Este trabajo que aquí presento es el resultado de muchas horas de esfuerzo y dedicación, pero también es fruto del apoyo de muchas personas que me han acompañado durante este tiempo. En estas primeras páginas quiero dar las gracias a todos los que me habéis ayudado, tanto dentro del laboratorio como fuera de él, porque al contrario de lo se podría pensar, ha sido tan importante el tiempo pasado entre probetas y matraces como el vivido fuera del laboratorio.

Quiero dar las gracias en primer lugar a Jose por darme la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio y poder llegar a este día. Quiero darte las gracias también por la gran cantidad de técnicas desconocidas para mí que has puesto a mi disposición.

Como no podía ser de otra manera las siguientes palabras son para la persona más especial durante estos años. Cuando empecé en el laboratorio aún no nos conocíamos, de hecho “llegaste por casualidad”, como dice la canción. Creo que es bastante obvio de quien estoy hablando pero por si aún quedan dudas estas palabras son para Patri. Cuando llegaste al laboratorio nunca podría haber imaginado todo lo que hemos pasado juntos estos años. Me fuiste ganando poco a poco, tanto por tu forma de ser en el laboratorio (ordenada, meticulosa, exigente) como por todas las experiencias que hemos vivido fuera de él (nunca olvidaré esas tardes de viernes tomando cervezas y arreglando el mundo). Eres la persona que siempre ha estado ahí, capaz de aguantar mis malos ratos y de darme un toque de atención cuando más lo necesitaba. Estoy muy orgulloso de todo lo que hemos conseguido juntos y de la familia que hemos formado. Estos últimos meses nos hemos separado en el terreno profesional, y no sabes cuánto se ha notado tu ausencia. Por suerte en el terreno personal seguimos juntos y espero que siga siendo así para siempre.

Ahora quiero hablar de una persona que aunque aún no lo sepa cambió mi vida para siempre. Mi pequeña gran revolución, mi hijo David. Tu llegada cambió todos los planes, pero sin ninguna duda el cambio ha sido a mejor. Porque solo con una sonrisa o un abrazo eres capaz de llenarme de alegría, porque no me imagino un día sin ti, porque lo eres todo. Solo espero poder enseñarte todo lo que quieras aprender y estar siempre a tu lado.

Volviendo al laboratorio no puedo pasar por alto todo lo que tengo que agradecerle a María José, a Ana y a Mari Paz. Desde que llegué al Hospital me acogisteis como a uno más y siempre estabais dispuestas a contestar a mis preguntas o a prestarme materiales (anda que no os he pedido cosas estos años). Además quiero agradecer a María José el haber aceptado formar parte del tribunal de mi tesis doctoral. También quiero dar las gracias a Alicia. Cuando llegaste al laboratorio me ayudaste a aprender técnicas nuevas y me hiciste ver la importancia de centrar mi investigación y mis objetivos.

En este trabajo se habla mucho sobre lípidos y debo confesar que antes de llegar al Hospital no eran mis moléculas favoritas. Por suerte esta situación ha cambiado y gran parte se la debo a Óscar. Ha sido un auténtico placer trabajar a tu lado y poder charlar acerca de los cambios en los niveles de este o aquel lípido o acerca del masas.



## Agradecimientos

Por supuesto no puedo olvidarme de Jorge. Cuando llegaste al Hospital eras más bien tirando a tímido pero poco a poco te fuiste soltando y me pude dar cuenta de la gran persona que eres. Como científico eres de los currantes y fuera de la ciencia eres un gran amigo que está en las buenas y en las malas siempre dispuesto a ayudar (ya sea descargando series y películas o echándome una mano con el word). Mucho ánimo para lo que te queda de tesis, que si bien es lo más duro también es lo más bonito. Aunque a veces parezca que los experimentos no marchan y los resultados no llegan, el único secreto es seguir intentándolo con tesón.

Quiero dar las gracias a todas las personas que forman el Servicio de Neurobiología. Sois un ejemplo de dedicación y de amor a la ciencia, ya que aún en condiciones difíciles sacáis lo mejor de vosotros mismos para hacer investigación de calidad. Muchas gracias por ayudarme y en muchos casos por enseñarme cosas nuevas.

Gracias también a todo el Servicio de Bioquímica del Hospital. Hemos estado muy cerca, tanto por ubicación geográfica, como por todo lo que me habéis ayudado durante estos años. Quiero hacer una mención especial a Celia y a Nacho (perdonadme el resto por hacer esta distinción). Celia, compañera de fatigas, muchas gracias por aguantarme en mi estado pretésico y por enseñarme que hay luz al final del túnel. Y a ti Nacho, simplemente decirte que eres un ejemplo tanto por tu buen hacer en el laboratorio como por tu eterno buen humor. Mucha suerte a los dos en todos vuestros proyectos.

Por supuesto tengo que dar las gracias a los doctores Lars Kuerschner y Christoph Thiele. No entenderéis lo que aquí escribo pero no podía olvidarme de vosotros. Aceptasteis que trabajase durante unos meses en vuestro laboratorio sin conocerme de nada, solo habiendo recibido un email, pero desde el primer día me ayudasteis y pusisteis a mi disposición todos los medios materiales que tenéis en el laboratorio. Solo fueron 3 meses los que estuve en Bonn, pero aprendí muchísimo y obtuve grandes resultados y fue en gran parte por vuestro tiempo y entrega.

Toca ahora salir del laboratorio y dar las gracias a todas las personas que me han acompañado durante estos cuatro años, y en algunos casos durante toda la vida. En primer lugar a mis amigos del Arturo Soria, compañeros de alegrías y fatigas durante tantos y tantos años. Llevamos juntos toda la vida y espero que sigamos juntos muchos años más. Me conocéis bien y sabéis que a veces puedo ser poco expresivo o llegar a ocultaros noticias importantes, pero en este caso debo ser justo y daros las gracias por todas las experiencias que hemos vivido juntos, por todos los viajes, por todos los momentos que hemos compartido y por supuesto por haberos convertido en los “grupitíos” de David.

No quiero olvidarme de los veranos en Santa Pola y de la buena gente con la que he compartido tantas cosas. Hemos pasado grandes experiencias juntos y aunque ahora nos veamos menos (nos vamos haciendo mayores) sabéis que sois muy importantes para mí. Gracias a vosotros esa playa sin olas y en la que hay que andar una buena cantidad de metros para que el mar cubra será siempre la más querida por mí.

Quiero agradecer también a toda la gente de Veterinaria su cariño y amistad incondicional. Llegué al departamento para hacer el trabajo fin de máster pero pronto pude ver que iba a conseguir mucho más. Desde el primer día me hicisteis sentir uno más, tanto dentro como fuera del laboratorio. Una vez terminado mi trabajo allí hemos

## **Agradecimientos**

mantenido la relación (aunque ahora nos veamos menos) y quiero que sepáis que os considero a todos como mis hermanos mayores científicos. Siempre que tenga una duda o necesite unas cañas acompañada de una charla científica (o no científica) recurriré a vosotros.

En estos años he conocido gente maravillosa y en este punto debo acordarme de ti Fani. Nos conocemos desde hace poco pero quiero que sepas que es un auténtico placer el habernos encontrado. Quiero aprovechar esta oportunidad para decirte que eres un ejemplo para mí. No he conocido a nadie que sea capaz de hacer todo lo que haces sin perder la sonrisa.

Y por supuesto a mi familia (la biológica y la política), en especial a mis padres y a mi hermana. Gracias a vosotros, a todo vuestro amor, cariño y dedicación soy hoy la persona que soy. Estoy muy orgulloso de teneros a mi lado y de todo lo bueno que me habéis enseñado. Si soy un buen padre y hermano es simplemente porque he aprendido de los mejores.



# Índice

<b>Resumen</b>	27
<b>Abstract</b>	29
<b>I – Abreviaturas</b>	31
<b>II – Introducción</b>	37
2.1. Enfermedad de Parkinson	39
2.1.1. Clínica	40
2.1.2. Genética	42
2.1.3. Bioquímica	44
2.1.4. Modelos animales	49
2.2. Astrocitos en enfermedades neurodegenerativas	51
2.3. Autofagia	55
2.3.1. Proteínas ATG y progresión de las distintas fases	56
2.3.2. Degradación selectiva de mitocondrias (mitofagia)	61
2.3.3. Autofagia en enfermedades neurodegenerativas	62
2.3.4. Autofagia en hígado	64
2.4. Lípidos y autofagia	65
2.5. Éter lípidos	69
2.5.1. Ruta de biosíntesis	70
2.5.2. Localización subcelular	70
2.5.3. Distribución en tejidos	72
2.5.4. Funciones	72
2.5.4.1. Papel estructural	72
2.5.4.2. Papel en los procesos de fusión/fisión de membranas	73
2.5.4.3. Papel antioxidante	73
2.5.4.4. Reservorio de segundos mensajeros	74
2.5.5. Éter lípidos y enfermedades	74

<b>III – Objetivos</b>	77
<b>IV – Materiales y métodos</b>	81
4.1. Listado de materiales	83
4.2. Métodos	87
4.2.1. Ratones	87
4.2.2. Genotipado de ratones	87
4.2.3. Aislamiento de fracciones subcelulares	88
4.2.4 Western-Blot	90
4.2.5. Lipidómica	91
4.2.6. Cultivos primarios de glía embrionaria	93
4.2.7. Inmunofluorescencia	94
4.2.8. Análisis de la morfología mitocondrial	95
4.2.9. Analizador de flujo metabólico (Seahorse XF)	95
4.2.9.1. Placas y kits	96
4.2.9.2. Mito Stress Kit	96
4.2.9.3. Realización de experimentos	98
4.2.10. Fluorescencia de lípidos: propargyl lipids y click reaction	99
4.2.10.1. Cromatografía en capa fina (TLC)	100
4.2.10.1.1. Extracción de lípidos de medio de cultivo	100
4.2.10.1.2. Extracción de lípidos de células en cultivo	101
4.2.10.2. Microscopía de fluorescencia	102
<b>V – Resultados</b>	103
5.1. Enriquecimiento de las fracciones subcelulares aisladas y cambios con el envejecimiento y la eliminación de Parkin	105
5.1.1. LC3-II en las distintas fracciones	105
5.1.2. Fracción mitocondrial	106
5.1.3. Fracción lisosomal	108
5.1.4. Fracción de retículo endoplásmico	108
5.2. Lipidómica de autofagosomas de hígado de ratones WT. Efecto de la inducción de autofagia y del envejecimiento	109

5.2.1. Cambios opuestos en los niveles de PS y PE	112
5.2.2. Alteraciones de PE-O y PC-O con el ayuno	114
5.2.3. Modificaciones de TAG y FA	114
5.4. Lipidómica de autofagosomas de hígado WT y PK KO tras activación de autofagia. Efecto de la ausencia de Parkin y del envejecimiento	114
5.4.1. Alteraciones de PE con el envejecimiento	116
5.4.2. Cambios en la proporción de PC-O y PE-O	118
5.4.3. Modificaciones en los niveles de LPC y LPE en PK KO	118
5.4.4. Cambios en Cer	118
5.4.5. Alteraciones de CHOL EST y TAG	120
5.5. Lipidómica de mitocondrias de hígado WT y PK KO tras activación de autofagia. Efectos de la eliminación de Parkin y del envejecimiento	122
5.5.1. Cambios en PS y PE	124
5.5.2. Alteraciones en LPC y LPE en PK KO	126
5.5.3. Cambios en Cer	126
5.6. Lipidómica de mitocondrias de cerebro WT y PK KO tras activación de autofagia. Efecto de la ausencia de Parkin y del envejecimiento	130
5.6.1. Cambios en PS y PE	132
5.6.2. Modificación del ratio éter lípido/fosfolípido	132
5.6.3. Alteraciones en la hidroxilación de Cer	134
5.7. Efectos de la ausencia de Parkin y de la activación de autofagia en astrocitos	136
5.7.1. Actividad autofágica	137
5.7.2. Morfología mitocondrial	140
5.7.3. Funcionalidad mitocondrial	142
5.8. Efectos de la inducción de daño mitocondrial en astrocitos WT y PK KO	142
5.8.1. Actividad autofágica	144
5.8.2. Actividad mitocondrial	147
5.9. Efectos de la estimulación de la síntesis de éter lípidos por incubación con HG en astrocitos WT y PK KO	148
5.9.1. Alteraciones de la composición lipídica	148
5.9.1.1. Cambios en las especies de PC, PC-O, PE y PE-O	150
5.9.2. Cambios lipidómicos en condiciones de ayuno	150



5.9.2.1. Alteraciones de PC-O y PE-O	152
5.9.3. Actividad autofágica tras retirada de suero	152
5.9.4. Funcionalidad mitocondrial en ausencia de suero	158
5.9.5. Modificaciones de la composición lipídica por la incubación con CCCP	157
5.9.6. Actividad autofágica en condiciones de daño mitocondrial	159
5.9.7. Funcionalidad mitocondrial en presencia de CCCP	165
5.10. Efectos de la adición de un éter lípido exógeno sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial en astrocitos. Cambios con la inducción de autofagia, de daño mitocondrial y con la eliminación de Parkin.	167
5.10.1. Captación y metabolismo de eLpPC	167
5.10.2. Localización subcelular del éter lípido exógeno	169
5.10.3. Actividad mitocondrial	178
<b>VI – Discusión</b>	183
6.1. Fraccionamiento subcelular y enriquecimiento de autofagosomas	185
6.2. Cambios en la composición lipídica de autofagosomas y mitocondrias debidas a la activación de autofagia, el envejecimiento y la ausencia de Parkin	187
6.2.1. Variaciones de los niveles de PE. Papel de PSD y PEMT en autofagia	189
6.2.2. Los cambios en lisofosfolípidos tras eliminar Parkin son distintos en las membranas de los autofagosomas y mitocondrias	191
6.2.3. Posibles implicaciones de los cambios en Cer en autofagia y funcionalidad mitocondrial	193
6.2.4. Implicaciones en la actividad autofágica y mitocondrial de los cambios observados en los niveles de éter lípidos	196
6.3. La supresión de Parkin modifica las tasas de autofagia basal y en ausencia de suero	198
6.4. El aumento de la síntesis de éter lípidos en astrocitos incrementa la capacidad autofágica y mitocondrial de forma dependiente de Parkin	201
6.5. La localización subcelular de los éter lípidos es clave para sus efectos sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial	203
<b>VII – Conclusiones</b>	207
<b>VIII – Bibliografía</b>	211





## **Índice de figuras**

### **I – Introducción**

Figura 1: Fases y síntomas de la enfermedad de Parkinson.	41
Figura 2: Fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.	42
Figura 3: Potenciales biomarcadores utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.	43
Figura 4: Alteraciones del metabolismo lipídico y de distintas clases de lípidos que tienen lugar en la enfermedad de Parkinson.	43
Figura 5: Circuitos neuronales afectados en la enfermedad de Parkinson.	45
Figura 6: Relación entre proteínas codificadas por genes mutados en la enfermedad de Parkinson y el tráfico sináptico.	47
Figura 7: Efectos de $\alpha$ -sinucleína y de las formas mutadas de la misma sobre distintas clases lipídicas.	48
Figura 8: Procesos bioquímicos alterados en la enfermedad de Parkinson.	49
Figura 9: Estructura química de los compuestos utilizados para inducir cuadros sintomáticos similares a los de la enfermedad de Parkinson en modelos animales.	50
Figura 10: La disfunción de los astrocitos contribuye al daño neuronal.	53
Figura 11: Funciones en astrocitos de proteínas codificadas por genes mutados en la enfermedad de Parkinson.	54
Figura 12: Acoplamiento del metabolismo lipídico entre neuronas y astrocitos.	55
Figura 13: Tipos principales de autofagia.	57
Figura 14: Complejos proteicos implicados en las distintas fases de la autofagia.	59
Figura 15: Mitofagia dependiente de Parkin.	62
Figura 16: Tipos de modulación de la autofagia mediada por lípidos.	68
Figura 17: Estructura de un diacil-, un alkyl-, y un alkenyl-glicerofosfolípido (plasmalógeno).	70
Figura 18: Localización subcelular de las enzimas implicadas en la biosíntesis de éter lípidos y de algunos de los intermediarios formados.	71

### **IV – Materiales y métodos**

Figura 19: Genotipado de ratones WT y PK KO.	88
Figura 20: Protocolo utilizado para el aislamiento de las fracciones subcelulares.	89
Figura 21: Disposición de la muestra y las distintas concentraciones de Nycodenz antes de la centrifugación y de las fracciones separadas después de la centrifugación.	90

Figura 22: Distintos protocolos de incubación para los experimentos de inmunofluorescencia.	94
Figura 23: Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y efecto de los compuestos del Mito Stress Kit.	96
Figura 24: Cinética de la tasa de consumo de oxígeno y variaciones causadas por la inyección de los compuestos del MitoStress Kit.	97
Figura 25: Protocolo utilizado para el trabajo con el propargil lípido.	100
Figura 26: Protocolos de incubación para los experimentos con eLpPC.	100

## **V – Resultados**

Figura 27: Enriquecimiento de LC3-II en las fracciones subcelulares aisladas de cerebros e hígados.	106
Figura 28: Enriquecimiento de la fracción mitocondrial en cerebros e hígados.	107
Figura 29: Enriquecimiento de la fracción lisosomal en cerebros e hígados.	108
Figura 30: Enriquecimiento de la fracción de retículo endoplásmico en cerebros e hígados.	109
Figura 31: Caracterización lipidómica de autofagosomas aislados a partir de hígados de ratones WT.	110
Figura 32: Porcentajes de las distintas clases lipídicas en autofagosomas aislados a partir de hígados de ratones WT.	111
Figura 33: Alteraciones de PE y PS de las membranas de autofagosomas de hígado debidos al ayuno y al envejecimiento.	113
Figura 34: Niveles de enzimas modificadoras de fosfolípidos, PEMT y PSD, en retículos endoplásmicos y mitocondrias aislados a partir de hígados de ratones WT.	113
Figura 35: Cambios en PE-O y PC-O detectados en las membranas de autofagosomas e inducidos por la activación de autofagia y el envejecimiento.	115
Figura 36: Porcentajes de TAG y FA en autofagosomas. Cambios debidos a la activación de autofagia y al envejecimiento.	115
Figura 37: Caracterización lipidómica de autofagosomas aislados a partir de hígados de ratones WT y PK KO.	116
Figura 38: Especies de PE de autofagosomas de ratones WT y PK KO tras ayuno de 6 horas. Cambios con la supresión de Parkin y el envejecimiento.	117
Figura 39: Especies de PC-O y PE-O de autofagosomas de ratones WT y PK KO tras ayuno de 6 horas. Alteraciones con la eliminación de Parkin y el envejecimiento.	119
Figura 40: Especies de LPC y LPE de autofagosomas de ratones WT y PK KO.	120

Figura 41: Especies de Cer de autofagosomas de ratones WT y PK KO.	121
Figura 42: Niveles de CHOL EST y TAG de autofagosomas de hígado. Cambios con el envejecimiento y la eliminación de Parkin.	121
Figura 43: Caracterización lipidómica de mitocondrias aisladas a partir de hígados de ratones WT y PK KO.	123
Figura 44: Especies de PE y PS de mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO. Modificaciones con la ausencia de Parkin y el envejecimiento.	125
Figura 45: Niveles de PEMT y PSD en retículos endoplásmicos y mitocondrias aislados a partir de hígados de ratones WT y PK KO.	125
Figura 46: Especies de LPC y LPE de mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO.	127
Figura 47: Comparación de los cambios en LPC y LPE en autofagosomas y mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO.	128
Figura 48: Especies de Cer de mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO. Alteraciones con la supresión de Parkin y el envejecimiento.	129
Figura 49: Comparación de los cambios en Cer en autofagosomas y mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO.	130
Figura 50: Caracterización lipidómica de mitocondrias aisladas a partir de cerebros de ratones WT y PK KO.	131
Figura 51: Especies de PE y PS y niveles de PSD de mitocondrias de cerebros de ratones WT y PK KO. Cambios con la supresión de Parkin y el envejecimiento.	133
Figura 52: Ratios éter lípido/fosfolípido en mitocondrias de cerebros e hígados. Modificaciones con la eliminación de Parkin y el envejecimiento.	134
Figura 53: Especies de Cer OH de mitocondrias de cerebros e hígados de ratones WT y PK KO. Cambios con la delección de Parkin y el envejecimiento.	135
Figura 54: Niveles de LC3 y p62 en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la activación de autofagia y el bloqueo de la degradación lisosomal.	137
Figura 55: Inmunomarcaje para LC3 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la retirada de suero.	138
Figura 56: Inmunomarcaje para p62 en astrocitos WT y PK KO. Efecto del ayuno.	140
Figura 57: Inmunomarcaje para LAMP1 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la ausencia de suero.	141
Figura 58: Morfología mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Efectos de la activación de autofagia y del bloqueo de la degradación lisosomal.	143
Figura 59: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la retirada de suero y la supresión de Parkin.	144



Figura 60: Niveles de LC3-I y LC3-II en astrocitos WT y PK KO. Alteraciones con la inducción de daño mitocondrial y el bloqueo de la degradación lisosomal.	145
Figura 61: Inmunomarcaje para LC3 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de CCCP.	145
Figura 62: Inmunomarcaje para p62 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la suplementación con CCCP.	146
Figura 63: Inmunomarcaje para LAMP1 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la incubación con CCCP.	147
Figura 64: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Cambios en presencia de CCCP y ausencia de Parkin.	148
Figura 65: Cambios en la composición lipídica de astrocitos causados por la eliminación de Parkin y la adición de HG.	149
Figura 66: Especies de PC, PC-O, PE y PE-O en astrocitos WT y PK KO y modificaciones causadas por el HG.	151
Figura 67: Cambios en la composición lipídica de astrocitos WT y PK KO inducidos por la retirada de suero en presencia de HG.	151
Figura 68: Especies de PC-O y PE-O en astrocitos WT y PK KO y cambios con la retirada de suero en presencia de HG.	153
Figura 69: Niveles de LC3-I y LC3-II en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la adición de HG, la retirada de suero y el bloqueo de la degradación lisosomal.	154
Figura 70: Inmunomarcaje para LC3 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la suplementación con HG y la inducción de autofagia.	155
Figura 71: Inmunomarcaje para p62 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de HG y del ayuno.	156
Figura 72: Inmunomarcaje para LAMP1 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de HG y de la retirada de suero.	157
Figura 73: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la suplementación con HG y la inducción de autofagia.	158
Figura 74: Cambios en la composición lipídica de astrocitos WT y PK KO tras la inducción de mitofagia en presencia de HG.	160
Figura 75: Niveles de LC3-I y LC3-II en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la adición de HG, la inducción de daño mitocondrial y el bloqueo de la degradación lisosomal.	161
Figura 76: Inmunomarcaje para LC3 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de HG y CCCP.	162
Figura 77: Inmunomarcaje para p62 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de HG y de la inducción de mitofagia.	163

Figura 78: Inmunomarcaje para LAMP1 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la incubación con HG y CCCP.	164
Figura 79: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la suplementación con HG y la posterior inducción de daño mitocondrial.	166
Figura 80: Niveles de eLpPC y epPC en medios de cultivo tras la incubación con astrocitos WT y PK KO.	168
Figura 81: Niveles de eLpPC y epPC en medios de cultivo tras la incubación con astrocitos WT y PK KO. Efectos de la activación de autofagia o mitofagia y el bloqueo de la degradación lisosomal.	169
Figura 82: Niveles de eLpPC y epPC en astrocitos WT y PK KO. Efectos de la activación de autofagia o mitofagia y el bloqueo de la degradación lisosomal.	170
Figura 83: Inmunomarcaje para eLpPC, TOM20 y LAMP1 en astrocitos WT en condiciones basales.	171
Figura 84: Localización subcelular de eLpPC en astrocitos WT y PK KO en presencia y en ausencia de suero.	172-174
Figura 85: Localización subcelular de eLpPC en astrocitos WT y PK KO en condiciones de ayuno. Co-marcaje con LC3.	175-176
Figura 86: Localización subcelular de eLpPC en astrocitos WT y PK KO en presencia de CCCP.	177
Figura 87: Efectos de la adición de eLpPC en presencia de suero sobre la funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO.	179
Figura 88: Efectos de la suplementación con eLpPC y la posterior retirada de suero sobre la funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO.	180
Figura 89: Efectos de la adición de eLpPC en presencia de CCCP sobre la funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO.	181

## **VI – Discusión**

Figura 90: Efectos del ayuno y del envejecimiento sobre la actividad de PSD y PEMT, la transferencia de fosfolípidos entre orgánulos y la síntesis de autofagosomas.	189
Figura 91: Síntesis de novo y modificación de esfingolípidos.	194
Figura 92: Efectos de la suplementación con éter lípidos exógenos sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial.	206



## **Índice de tablas**

### **I – Introducción**

Tabla 1: Síntomas motores y no motores de la enfermedad de Parkinson.	40
Tabla 2: Causas monogénicas de enfermedad de Parkinson.	45
Tabla 3: Proteínas ATG implicadas en la formación del autofagosoma en mamíferos y levaduras.	58

### **IV – Materiales y métodos**

Tabla 4: Secuencia de nucleótidos de los primers utilizados para las PCR de WT y de PK KO.	87
Tabla 5: Estándares lipídicos utilizados en los análisis lipidómicos.	93

### **V – Resultados**

Tabla 6: Cambios en los niveles de distintas clases lipídicas de autofagosomas provocados por la activación de autofagia y el envejecimiento.	112
Tabla 7: Cambios en distintas clases lipídicas en autofagosomas de hígados de ratones WT y PK KO debidos a la activación de autofagia y al envejecimiento.	117
Tabla 8: Cambios en los niveles de distintas clases lipídicas en mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO inducidos por la activación de autofagia y el envejecimiento.	124
Tabla 9: Cambios de distintas clases lipídicas en mitocondrias de cerebros de ratones WT y PK KO provocados por la activación de autofagia y el envejecimiento.	132



## Resumen

### **“Nuevas modificaciones lipídicas implicadas en autofagia. Papel en la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento.”**

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa en cuanto al número de personas afectadas. El envejecimiento es el mayor factor de riesgo de padecerla y se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la Substantia Nigra y por la presencia de agregados conocidos como cuerpos de Lewy.

La agregación proteica es producto de alteraciones en el correcto plegamiento de proteínas y en los procesos intracelulares de degradación, el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia. Los agregados proteicos inducen daños que desencadenan la muerte neuronal.

La macroautofagia (a partir de ahora autofagia) se caracteriza por la formación de orgánulos de doble membrana, autofagosomas, que engloban material citoplásmico para su degradación en lisosomas. La correcta progresión de las distintas fases de la autofagia requiere la participación de diferentes clases de lípidos que controlan la iniciación de la autofagia, la lipidación de proteínas clave como LC3 o la síntesis de las membranas de los autofagosomas y su posterior fusión con la membrana de los lisosomas.

En este trabajo se caracterizó la composición lipídica de las membranas de autofagosomas y mitocondrias, aisladas de cerebros e hígados de ratones WT y nulos para Parkin (PK KO). Parkin es una E3 ubiquitina ligasa cuyas alteraciones genéticas producen enfermedad de Parkinson recesiva con inicio temprano. Dentro de los distintos tipos de autofagia uno de los más estudiados es la degradación de mitocondrias (mitofagia) dependiente de Parkin. A raíz de los resultados obtenidos, se identificaron varias posibles dianas terapéuticas.

En autofagosomas aislados a partir de hígados se detectaron alteraciones en fosfolípidos (fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, éter lípidos), lisofosfolípidos, ceramidas y triacilglicerolos. Los cambios en fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina debidos al envejecimiento y a la eliminación de Parkin se relacionaron con cambios en los niveles de las enzimas FosfatidilEtanolamina Metil Transferasa y FosfatidilSerina Descarboxilasa. Por otro lado, los éter lípidos aumentaron en respuesta a la activación de autofagia.

El análisis de la composición lipídica de mitocondrias permitió detectar alteraciones en fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y éter lípidos), lisofosfolípidos e hidroxilación de esfingolípidos en respuesta al envejecimiento y a la delección de Parkin. Al igual que ocurría en los autofagosomas, los cambios en fosfatidiletanolamina iban asociados a los niveles de las enzimas FosfatidilEtanolamina Metil Transferasa y FosfatidilSerina Descarboxilasa. Las modificaciones en lisofosfolípidos eran distintos a los observados en autofagosomas, apuntando a una regulación dependiente de orgánulo y, además, podían clasificarse en función del grado de insaturación del ácido graso apuntando a cambios en la actividad de enzimas modificadoras de lípidos. Del mismo modo, los cambios en ceramidas eran distintos en los dos orgánulos y podían clasificarse



en función de la longitud del ácido graso apuntando a la implicación de enzimas modificadoras de ceramidas.

Todos estos resultados demostraron que la activación de autofagia, el envejecimiento y la supresión de Parkin alteraban la composición lipídica de las membranas de autofagosomas y mitocondrias. Estos cambios podrían afectar a la autofagia y a la funcionalidad mitocondrial, dos de los procesos celulares afectados en la enfermedad de Parkinson.

A la vista de los cambios en la proporción de éter lípidos en respuesta a la activación de autofagia y a la ausencia de Parkin, se estudió si la estimulación de la síntesis de esta clase lipídica modulaba la actividad autofágica y la funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. El incremento de los niveles de éter lípidos aumentó la actividad autofágica en condiciones de retirada de suero. Además, en condiciones de daño mitocondrial, mejoró la funcionalidad mitocondrial. Ambos efectos eran dependientes de Parkin.

A continuación, se estudió si dichos efectos se debían a cambios en la localización subcelular de los éter lípidos producidos. Para ello, se suplementaron las células con un alquino éter lípido capaz de ser visualizado mediante experimentos de cromatografía en capa fina y microscopía.

Los astrocitos captaron el éter lípido exógeno incrementándose este proceso en ausencia de suero. En condiciones basales, el éter lípido exógeno se localizó preferentemente en las mitocondrias, mientras que la activación de autofagia promovió la movilización del lípido a las membranas de los autofagosomas y de los lisosomas en astrocitos WT. Por otro lado, en condiciones de daño mitocondrial, el lípido exógeno no era movilizado y revertía algunas de las alteraciones de la funcionalidad mitocondrial, en un proceso dependiente, al menos en parte, de la proteína Parkin.

Estos resultados demostraron que el incremento de los niveles de éter lípidos estimuló la actividad autofágica mediante la transferencia de esta clase lipídica a las membranas de los autofagosomas, lo que se tradujo en un mayor número de estos orgánulos que se fusionaban con los lisosomas. Además, estos procesos eran dependientes de la proteína Parkin, apuntando a las mitocondrias como posibles donadoras de membrana para la formación de los autofagosomas.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran la importancia que tienen las alteraciones de la composición lipídica de orgánulos en la enfermedad de Parkinson y, además, que la estimulación de la síntesis de éter lípidos es capaz de modular las tasas de actividad autofágica y de funcionalidad mitocondrial. Por lo tanto, la modulación de los niveles de clases lipídicas puede ser usada en un futuro para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y de otras enfermedades neurodegenerativas.

## Abstract

### **“New autophagy related lipid modifications in aging and Parkinson’s disease.”**

Parkinson’s disease is the second most prevalent neurodegenerative disease, only after Alzheimer’s disease. Aging is the most important risk factor of suffering the disease. It courses with Substantia Nigra’s neuronal death and intracellular protein aggregates, known as Lewy’s bodies.

Protein aggregation is a product of alterations in the correct folding of proteins and in the intracellular degradation processes, ubiquitin-proteasome system and autophagy. These aggregates inhibit autophagy and induce damage (Reactive Oxygen Species production, microglial activation, mitochondrial dysfunction) that promotes the neuronal death.

Macroautophagy (hereafter termed autophagy) is characterized by the formation of double membrane organelles, autophagosomes, which engulf cytoplasmic material to their degradation into lysosomes. One of the most studied types of autophagy is Parkin dependent mitophagy. Lipids are important to the correct progression of the autophagic process by controlling autophagy initiation, LC3 lipidation or synthesis of autophagosomal membranes and their fusion with lysosomes.

In this work, lipidomic composition of autophagosomal and mitochondrial membranes was characterized. Organelles were isolated from brains and livers from WT and Parkin null (PK KO) mice. There were changes in several lipid classes with autophagy activation, aging and Parkin loss. Also, ether lipid levels were increased in cultured astrocytes in order to modulate autophagy and mitochondrial functionality.

In liver’s autophagosomes there were changes in phospholipids (phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, ether lipids), lysophospholipids, ceramides and triacylglycerols. Changes in phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine due to aging and Parkin loss were related to changes in PhosphatidylEthanolamine Methyl Transferase and PhosphatidylSerine Decarboxylase levels. Ether lipids increase in response to autophagy activation.

In mitochondria there were changes in the levels of phospholipids (phosphatidylethanolamine, ether lipids), lysophospholipids and sphingolipids hydroxylation processes in response to aging and Parkin loss. Changes in phosphatidylethanolamine were related to changes in PhosphatidylEthanolamine Methyl Transferase and PhosphatidylSerine Decarboxylase as it happens in autophagosomes. Changes in lysophospholipid were different than the ones observed in autophagosomes, pointing to an organelle-dependent regulation of lipid levels. Lysophospholipid changes were different according to the fatty acid’s unsaturation grade pointing to changes in lipid-modifying enzymes activity or levels. In the same way, ceramide changes were different in the organelles and were classified according to the fatty acid’s length pointing to activity of ceramide-modifying enzymes in the regulation of this lipid class levels.

These results demonstrated that autophagy activation, aging and Parkin loss altered lipidomic composition of autophagosomal and mitochondrial membranes. These

changes could affect autophagy and mitochondrial functionality, cellular processes that are affected in Parkinson's disease.

Having characterized ether lipid changes due to autophagy activation and Parkin loss, WT and PK KO cultured astrocyte's ether lipid levels were increased and autophagy and mitochondrial functionality were studied. Ether lipid synthesis stimulation increases autophagic activity in non-serum conditions. In mitochondrial damage conditions, mitochondrial functionality was increased. Both effects due to increase in ether lipid's levels were Parkin-dependent.

By using alkine ether lipids that can be monitored by TLC and microscopy experiments it was studied if these effects were due to changes in ether lipid subcellular localization.

Astrocytes uptook exogenous ether lipid, and this process was upregulated in non-serum conditions. In basal conditions, exogenous ether lipid located preferentially in mitochondria, but autophagy activation induced a mobilization of this lipid to autophagosomal and lysosomal membranes in WT astrocytes. In mitochondrial damage conditions, exogenous lipid retained in mitochondrial membranes reverting some of the mitochondrial functionality's alterations in a Parkin-dependent way.

These results demonstrated that ether lipid's levels increase stimulated autophagy by transference of this lipid class to autophagosomal and lysosomal membranes. This lipid transference increased autophagosomal synthesis and their fusion with lysosomes. Parkin dependence in this process pointed mitochondria as membrane sources for autophagosomal synthesis.

Lipidomic and in vitro experiments results, demonstrated the importance of changes in lipidomic composition of different organelles in aging and Parkinson's disease, and the modulation of autophagy and mitochondrial functionality by increasing ether lipid levels in cultured astrocytes. All these processes could revert some of the alterations due to Parkin loss, and ether lipid levels modulation could be a potential therapeutic strategy for Parkinson's and other neurodegenerative diseases.

### I. Abreviaturas

**AA:** Ácido araquidónico.

**AGPS:** Alkilglicerol fosfato sintasa.

**ATG:** Genes relacionados con autofagia.

**ATP13A2:** ATPase Cation Transporting 13A2.

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado de cerebro.

**CD36:** Cluster of Differentiation 36 (también llamada Platelet glycoprotein 4).

**CCCP:** Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhenyl-hydrazone.

**Cer:** Ceramida.

**Cer OH:** Ceramida hidroxilada.

**CerS:** Ceramida Sintasa.

**CHOL:** Colesterol.

**CHOL EST:** Ésteres de colesterol.

**Cito:** Citosol.

**Cit C:** Citocromo C.

**CL:** Cardiolipina.

**CMA:** Autofagia mediada por chaperonas.

**CQ:** Cloroquina.

**DAG:** Diacilgliceroles.

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-phenylindole.

**DBS:** Estimulación cerebral profunda.

**DHA:** Ácido docosahexaenoico.

**DHAP:** Dihidroxiacetona fosfato.

**dhCer:** Dihidro Ceramida.

**dhHexCer:** Dihidro HexosilCeramida.

**DJ-1:** Protein deglycase DJ-1.

**dl-BSA:** delipidated Bovine Serum Albumin.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico.

## Abreviaturas

**DNAJC6:** DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C6.

**ECAR:** Tasa de acidificación extracelular.

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid.

**eLpPC:** Éter liso propargil fosfatidilcolina.

**EPG5:** Ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog.

**epPC:** Éter propargil fosfatidilcolina.

**FA:** Ácido graso.

**FA2H:** Fatty Acid 2-Hydroxylase.

**FBS:** Suero fetal bovino.

**FCCP:** Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine.

**FIP200:** FAK family-Interacting Protein of 200 KDa.

**FYVE:** Fab 1(yeast orthologue of PIKfyve), YOTB, Vac1 (vesicle transport protein) EAA1.

**GBA:** Glucocerebrosidasa

**GNDF:** Factor neurotrófico derivado de células gliales.

**GFP:** Proteína Fluorescente Verde.

**GNPAT:** Glicerolfosfato O-aciltransferasa.

**HAV:** Autofagolisosomas.

**HBSS:** Hanks's Balanced Salt Solution.

**HexCer:** HexosilCeramida.

**HexCer OH:** HexosilCeramida hidroxilada.

**HG:** Hexadecilglicerol.

**Hom:** Homogeneizado.

**HRP:** Peroxidasa de rábano.

**Hsc70:** Heat shock 70 kDa protein.

**Insat:** Insaturado.

**L-15:** Leibovitz-L15.

**LAMP1:** Lysosomal Associated Membrane Protein 1.

**LAMP2A:** Lysosomal Associated Membrane Protein 2A.

**LAV:** Vesículas autofágicas o autofagosomas.

## Abreviaturas

**LC3:** Microtubule-associated protein 1 Light Chain 3.

**LC-MS/MS:** Cromatografía líquida-Espectrometría de masas.

**L-DOPA:** L-dopamina.

**Liso:** Lisosomas.

**LPC:** Lisofosfatidilcolina.

**LPE:** Lisofosfatidiletanolamina.

**LRRK2:** Leucine-Rich Repeat Kinase 2.

**MAMs:** Membranas asociadas a mitocondrias.

**Mito:** Mitocondrias.

**MPTP:** 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.

**mTORC1:** mammalian Target of Rapamycin Complex 1.

**NBR1:** Next to BRCA1 gene 1.

**OCR:** Tasa de consumo de oxígeno.

**PA:** Ácido fosfatídico.

**PAS:** Fagóforo.

**PARL:** Presenilins-associated rhomboid-like protein.

**PBS:** Buffer fosfato salino.

**PBS-T:** Buffer fosfato salino – Tween 20.

**PC:** Fosfatidilcolina.

**PC-O:** Éter lípido con colina.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PE:** Fosfatidiletanolamina.

**PEMT:** Fosfatidiletanolamina Metil Transferasa.

**PE-O:** Éter lípido con etanolamina.

**PET:** Tomografía de Emisión de Positrones.

**PEX7:** Peroxisomal membrane protein 7.

**PFA:** Paraformaldehído.

**PG:** Fosfatidilglicerol.

**PH:** Pleckstrin homology.

**PI:** Fosfatidilinositol.

## Abreviaturas

**PI3KCIII:** Fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III.

**PI3P:** Fosfatidilinositol 3 fosfato.

**PI(3,5)P2:** Fosfatidilinositol (3,5) bisfosfato.

**PINK1:** PTEN-Induced Putative Kinase 1.

**PKB:** Proteína quinasa B.

**PK KO:** Parkin Knock-Out.

**PLA2G6:** Fosfolipasa A2 de grupo 6.

**PNPLA3:** Patatin-like phospholipase domain-containing enzyme 3.

**PNPLA8:** Patatin-like phospholipase domain-containing enzyme 8.

**pPC:** Propargil fosfatidilcolina.

**PS:** Fosfatidilserina.

**PS-O:** Éter lípido con serina.

**PSD:** Fosfatidilserina Descarboxilasa.

**PS-O:** Éter lípido con serina.

**PUFAs:** Ácidos grasos poliinsaturados.

**PX:** Phox homology.

**Rab:** Ras-associated binding.

**RCDP:** Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata.

**RE:** Retículo Endoplásmico.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**Sat:** Saturado.

**SM:** Esfingomielina.

**SNARE:** SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor.

**SNc:** Substantia Nigra pars compacta.

**SPECT:** Tomografía computarizada de emisión monofotónica.

**SYNJ1:** Synaptojanin 1.

**TAG:** Triacilglicérol.

**TECPR1:** Tectonin Beta-Propeller Repeat Containing 1.

**TFB:** Tetrafluoroborato.

**TLC:** Cromatografía en capa fina.

## **Abreviaturas**

**TOM20:** Translocase of the Outer Mitochondrial membrane 20.

**ULK1:** Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1.

**VAMP2:** Vesicle Associated Membrane Protein 2.

**VDAC:** Voltage Dependent Anionic Channel.

**VPS15:** Vacuolar Protein Sorting 15.

**VPS34:** Vacuolar Protein Sorting 34.

**WIPI:** WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein.

**WT:** Wild Type





## **II - Introducción**



## II – Introducción

### 2.1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la Substantia Nigra pars compacta (SNc) (ubicada en el “midbrain” del cerebro) y la formación de cuerpos de Lewy que desencadenan múltiples síntomas, siendo los motores (temblor en reposo, rigidez, bradicinesia [lentitud de movimientos voluntarios y automáticos] e inestabilidad postural) los más representativos (Kalia and Lang 2015).

Fue descrita por el doctor James Parkinson (1755-1824) en un tratado médico escrito en 1817 (Parkinson 2002). El doctor Parkinson nombró a la enfermedad “shaking palsy” (parálisis agitante) debido a los síntomas motores presentes en los seis pacientes en los que la caracterizó. El cambio de nombre de la enfermedad al de su descubridor se llevó a cabo en la segunda mitad del siglo XIX y se debió en gran parte a los trabajos del médico francés Jean Marie Charcot (1825-1893).

Los factores de riesgo más importantes para sufrir la enfermedad de Parkinson son: la edad, la exposición a distintos factores ambientales y la alteración de algunos genes.

La relación de la enfermedad de Parkinson y la edad se ha demostrado en estudios epidemiológicos en los que se muestra que tanto la prevalencia (número de afectados frente al total de la población) como la incidencia (número de nuevos casos frente a la población total en un período de tiempo determinado) aumentan con la edad. La tasa de prevalencia es de 300 casos/100.000 individuos mientras que la de incidencia es de 8-18 nuevos casos/100.000 individuos/año. La tasa de prevalencia aumenta de forma considerable si solo se analizan los individuos de edad avanzada, 1.000 casos/100.000 individuos mayores de 60 años y 3.000 casos/100.000 en mayores de 80 años (Lee and Gilbert 2016).

La conexión entre la enfermedad de Parkinson y la edad también se hace patente en el hecho de que existe un mayor número de casos en países desarrollados en los que la esperanza de vida es mayor. Además, se estima que en las próximas décadas aumentará de manera considerable el número de afectados debido al incremento de la longevidad de los individuos.

La exposición a distintos factores ambientales como factores de riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson se ha descrito en numerosos estudios epidemiológicos. Dentro de estos factores ambientales se encuentran, entre otros, la exposición continuada a herbicidas, pesticidas y a otros compuestos como el paraquat o la rotenona, vivir en entornos rurales o beber agua de pozos de forma continuada (Noyce, Bestwick et al. 2012).

Por último, la dependencia de la enfermedad de Parkinson y alteraciones a nivel genético se ha demostrado mediante la caracterización de individuos de la misma familia

## Introducción

que padecían la enfermedad de Parkinson y que presentaban alteraciones en genes específicos.

El hecho de que se hayan caracterizado distintos factores de riesgo no significa que en cada uno de los casos la enfermedad esté inducida por uno solo, sino que se piensa que es la combinación de varios (envejecimiento, factores ambientales y factores genéticos) los que llevan a la aparición y progresión de la enfermedad.

### 2.1.1. Clínica

La muerte neuronal y la agregación proteica desencadenan una serie de síntomas motores y no motores, siendo los primeros los utilizados para su diagnóstico. Los no motores aparecen en estadios más tempranos de la enfermedad (generalmente aparecen varias décadas antes de que debuten los síntomas motores y de que se lleve a cabo el diagnóstico de la enfermedad) y son los mismos que aparecen en otras enfermedades neurodegenerativas. En este grupo se engloban síntomas neuro-psiquiátricos (trastornos afectivos, alteraciones cognitivas, demencia), trastornos del sueño (somnolencia diurna, insomnio, sueño fragmentado) o trastornos digestivos (disfagia, náuseas, estreñimiento) (tabla 1).

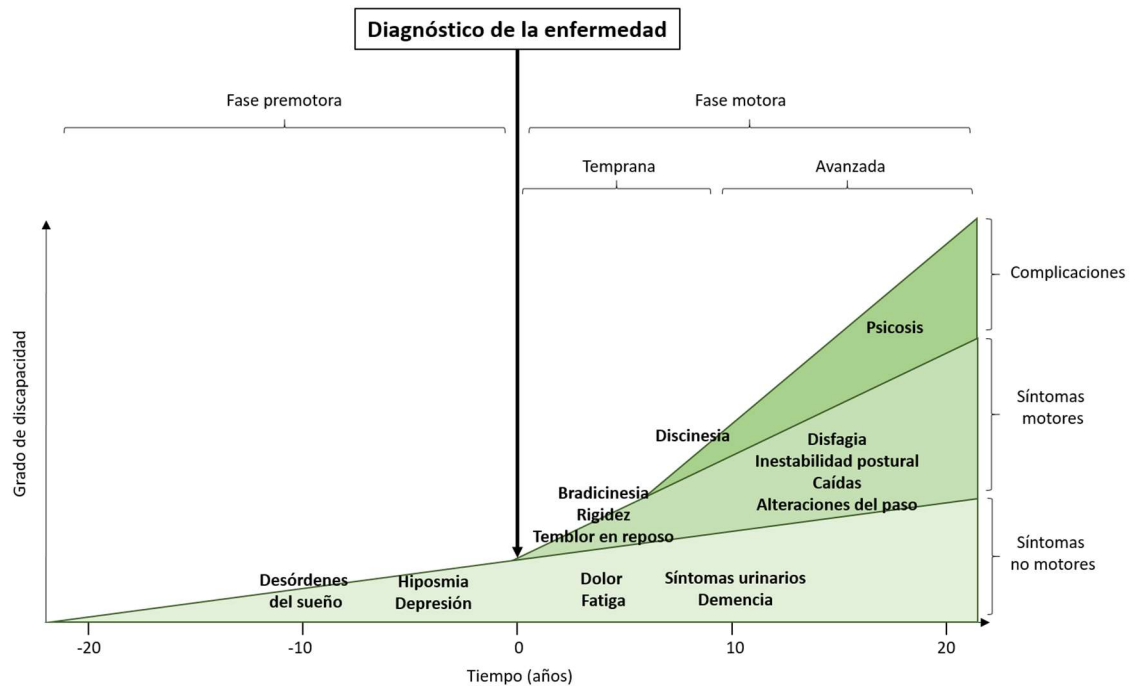
Síntomas motores	Síntomas no motores			
	Neuro-psiquiátricos	Del sueño	Autonómicos	Sensoriales
Temblor en reposo	Trastornos afectivos	Somnolencia diurna	Hipotensión ortostática	Dolor
Rigidez	Alucinaciones, delirios	Insomnio	Sudoración excesiva	Parestesias
Bradicinesia	Demencia	Sueño fragmentado	Seborrea	Hiposmia, anosmia
Inestabilidad postural	Alteraciones cognitivas		Alteraciones micción	Alteraciones visuales

**Tabla 1: Síntomas motores y no motores de la enfermedad de Parkinson.** Adaptado de la página web de la Federación Española de Parkinson ([www.esparkinson.es](http://www.esparkinson.es))

La diagnosis de la enfermedad va asociada a la caracterización de los síntomas motores y en este punto ya se ha producido la muerte de una importante cantidad de neuronas dopaminérgicas. Esto unido al hecho de que en la actualidad no exista ningún tratamiento capaz de inducir la génesis de nuevas neuronas hace que sea imprescindible la diagnosis de la enfermedad en estadios más tempranos (Kalia and Lang 2015). En la figura 1 se indican las distintas fases de la enfermedad (fase premotora y fase motora) y algunos de los síntomas, tanto no motores como motores que caracterizan cada fase.

En la actualidad, todos los tratamientos que se utilizan en la enfermedad de Parkinson van encaminados a paliar los síntomas motores y no motores y pueden clasificarse en terapias sintomáticas e intervenciones quirúrgicas.

## Introducción



**Figura 1: Fases y síntomas de la enfermedad de Parkinson.** Adaptado de (Kalia and Lang 2015).

La terapia sintomática está centrada en aumentar el tono dopaminérgico que se ve afectado por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la SNc. Este aumento del tono dopaminérgico se logra mediante la administración de distintos compuestos que actúan como análogos de la dopamina, como agonistas de los receptores dopaminérgicos o como inhibidores de las enzimas encargadas de la degradación de este neurotransmisor (figura 2).

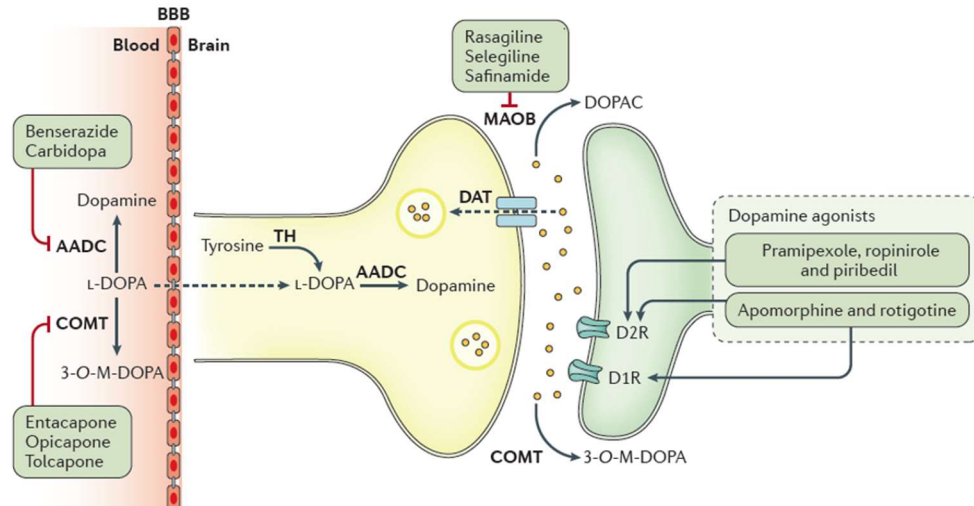
En el caso del tratamiento de los síntomas no motores, los fármacos utilizados son los mismos que para el resto de las enfermedades neurodegenerativas. Dentro de este grupo se engloban los fármacos frente a la ansiedad, depresión, demencia, psicosis, alteraciones del sueño, fatiga, etc...

Las intervenciones quirúrgicas incluyen procedimientos de distinto grado de invasión que buscan paliar los síntomas asociados a la enfermedad. En este apartado se incluyen la terapia génica, el trasplante celular y la estimulación cerebral profunda (DBS, por sus siglas en inglés). Los dos primeros se encuentran en fase de ensayo clínico mientras que la DBS se utiliza de forma rutinaria.

La diagnosis tardía de la enfermedad (cuando ya han aparecido los síntomas motores y se ha producido muerte neuronal) y el hecho de que todos los tratamientos actuales sean paliativos, hace imprescindible la búsqueda de marcadores que permitan la diagnosis en los estadios tempranos. Este diagnóstico temprano permitiría tratar a los pacientes en la fase pre-motora impidiendo que continuasen los procesos de muerte neuronal. En la actualidad, se están estudiando distintos marcadores clínicos, como alteraciones olfativas, técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), marcadores patológicos mediante biopsias de tejidos periféricos, genéticos y bioquímicos. Dentro de

## Introducción

los marcadores bioquímicos, se está estudiando la aplicabilidad de la determinación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en el Sistema Nervioso Periférico (Visanji, Marras et al. 2014), de la hiperfosforilación de esta proteína (Donadio, Incensi et al. 2014) y de los niveles totales de  $\alpha$ -sinucleína, DJ-1 (Protein deglycase DJ-1), tau y  $\beta$ -amiloide en muestras de líquido cefalorraquídeo (Parnetti, Castrioto et al. 2013).



**Figura 2: Fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.** Los tratamientos buscan aumentar el tono dopaminérgico inhibiendo la degradación de dopamina o incrementando su captación en la post-sinapsis. AADC: L-Aminoácido aromático Descarboxilasa. BBB: Barrera hematoencefálica. COMT: Catecol-O-Metiltransferasa. D1R: Receptores para Dopamina tipo 1. D2R: Receptores para Dopamina tipo 2. MAOB: MonoAmino Oxidasa tipo B. TH: Tirosina Hidroxilasa. Tomado de (Poewe, Seppi et al. 2017).

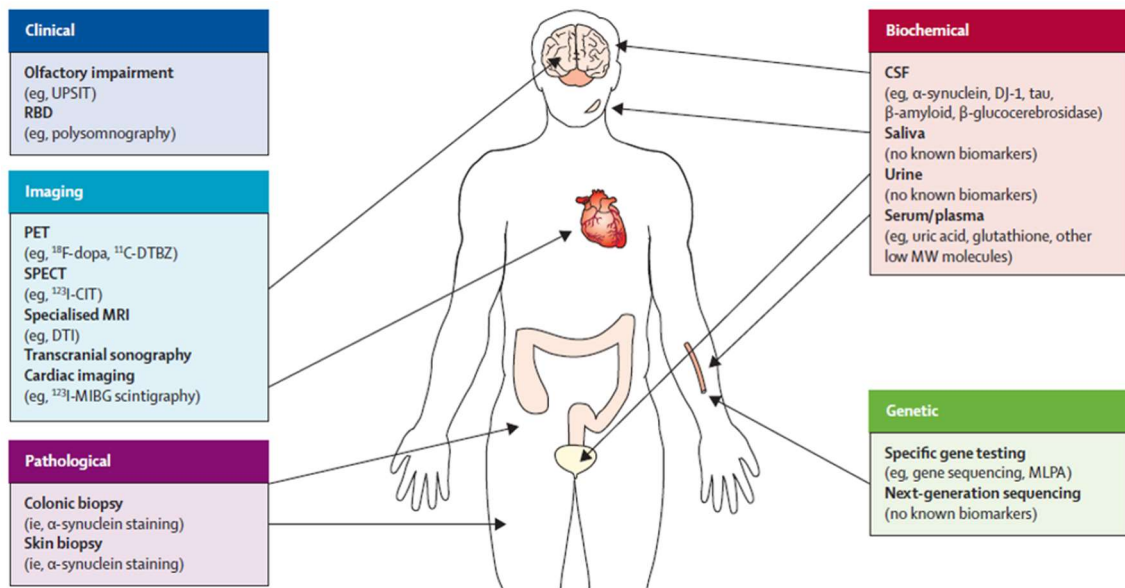
Además, en los últimos años diversos estudios han caracterizado la alteración de los niveles de distintas clases lipídicas en muestras de cerebros post-mortem. Se está analizando si estas alteraciones también tienen lugar en fase preclínica y si pueden utilizarse como marcadores de la enfermedad. Se han descrito alteraciones de los niveles de distintas clases lipídicas en muestras de suero (Guedes, Chan et al. 2017), en la composición de ácidos grasos en muestras de tejido post-mortem (Abbott, Jenner et al. 2015), así como en la composición de las balsas lipídicas (lipid rafts) (Fabelo, Martin et al. 2011) y en los procesos de peroxidación lipídica (de Farias, Maes et al. 2016). Además, se han observado disminuciones en los niveles de colesterol (CHOL), de ácido fosfatídico (PA) y de esfingomielina (SM) e incrementos de diacilglicerol (DAG) y triacilglicerol (TAG) entre otras alteraciones (figura 4) (Alecú and Bennett 2019).

Teniendo en cuenta los cambios observados, se han propuesto a las alteraciones de distintas clases lipídicas y en el metabolismo lipídico como marcadores de la enfermedad. Para confirmar este extremo es necesario caracterizar esta composición lipídica en la fase pre-clínica de la enfermedad (Kubo 2016).

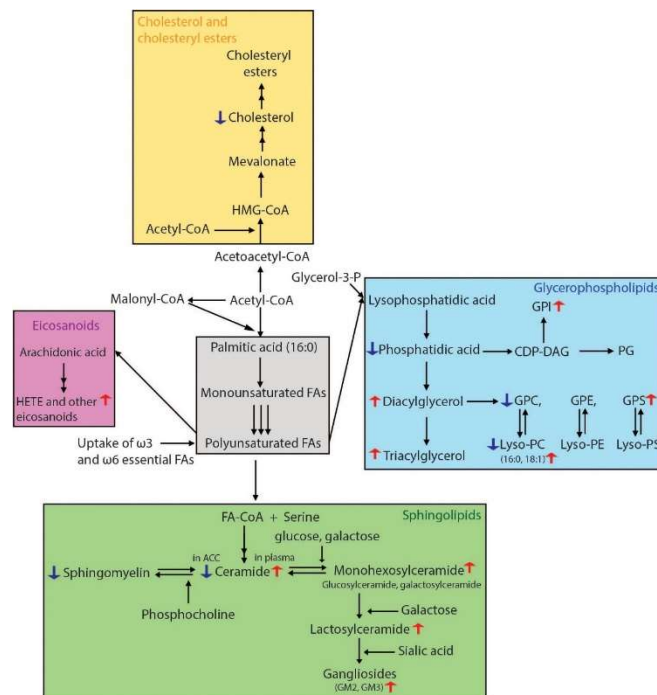
### 2.1.2. Genética

Actualmente, se relaciona el incremento en el riesgo a sufrir enfermedad de Parkinson con alteraciones en 19 genes. Las causas genéticas se engloban en dos grandes

## Introducción



**Figura 3: Potenciales biomarcadores utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.** CSF: Líquido cefalorraquídeo. PET: Tomografía por Emisión de Positrones. RBD: Desórdenes de la fase REM. SPECT: Tomografía computarizada de emisión monofotónica. Tomado de (Kalia and Lang 2015).



**Figura 4: Alteraciones del metabolismo lipídico y de distintas clases de lípidos que tienen lugar en la enfermedad de Parkinson.** Se muestran los cambios en el metabolismo del colesterol, de eicosanoides, de glicerofosfolípidos y de esfingolípidos. DAG: Diacilglicerol. HETE: Hidroxieicotetraenoico. HMG: Hidroximetilglutaril. GPC: Glicerofosfatidilcolina. GPE: Glicerofosfatidiletanolamina. GPI: Glicerofosfatidilinositol. GPS: Glicerofosfatidilserina. PC: Fosfatidilcolina. PE: Fosfatidiletanolamina. PI: Fosfatidilinositol. PG: Fosfatidilglicerol. PS: Fosfatidilserina. Tomado de (Alecú and Bennett 2019).



## Introducción

grupos: autosómicas dominantes y autosómicas recesivas. En el caso de las primeras, la mutación de un determinado gen implica un aumento de la expresión o función de la proteína codificada. Por el contrario, en el otro grupo, la alteración genética provoca una menor o nula expresión de la proteína codificada por el gen y, por lo tanto, una menor función de ésta, lo que induce el desarrollo de la enfermedad (Deng, Wang et al. 2018). En la tabla 2 se muestran las distintas formas genéticas de la enfermedad de Parkinson indicando el gen alterado, la proteína que codifica y la función de la proteína codificada.

Además de la mutación en estos genes, se ha descrito que mutaciones en otros genes no causan enfermedad de Parkinson pero sí incrementan el riesgo de padecerla. Entre estos genes se encuentran el que codifica para la glucocerebrosidasa (GBA) y el que codifica para la proteína tau.

Los casos de enfermedad de Parkinson debidos a alteraciones genéticas se conocen como casos familiares de la enfermedad y, por lo general, aparecen a una edad más temprana que los casos en los que no existe un componente genético (casos esporádicos). Si la enfermedad aparece antes de los 50 años se conoce como caso de temprana aparición y si aparece antes de los 40 años se conoce como caso juvenil. Dentro de los casos familiares de la enfermedad de Parkinson los más numerosos son los inducidos por alteraciones del gen que codifica para LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) en los autosómicos dominantes y Parkin en los autosómicos recesivos.

### 2.1.3. Bioquímica

Tanto en los casos esporádicos como familiares de la enfermedad se produce neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas de la SNc y la aparición de agregados proteicos conocidos como cuerpos de Lewy. La muerte neuronal a nivel de la SNc produce una disminución de la liberación del neurotransmisor dopamina en el estriado (figura 5) y es la causa de los síntomas motores que caracterizan a la enfermedad.

Además de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, se produce degeneración en otras regiones cerebrales (corteza, amígdala, hipocampo) en estadios avanzados de la enfermedad que provocan la aparición de síntomas no motores (Dickson 2012).

Los cuerpos de Lewy son agregados proteicos que se forman en el interior de las neuronas y que, en último término, causan la muerte de estas células. En estos agregados se encuentran distintas proteínas como  $\alpha$ -sinucleína, p62 o Parkin. La agregación de estas proteínas se asocia a procesos de desregulación en la homeostasis de proteínas que caracterizan a la enfermedad y que se deben a alteraciones en el correcto plegamiento de proteínas, como ocurre con  $\alpha$ -sinucleína, y en la degradación de proteínas incorrectamente plegadas mediante el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia. En este sentido se ha demostrado que las formas anómalas de  $\alpha$ -sinucleína son capaces de inhibir la autofagia (Cuervo, Stefanis et al. 2004, Winslow, Chen et al. 2010).

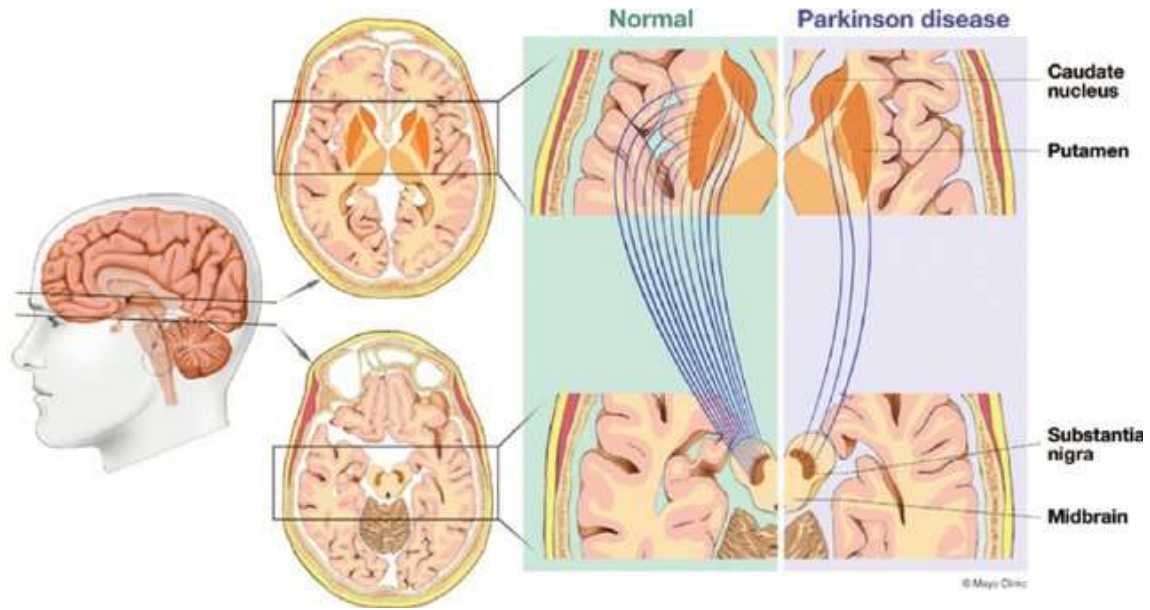
Además del efecto inhibitorio de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína sobre la autofagia y la funcionalidad lisosomal, la mutación de otros genes altera estos procesos celulares.

## Introducción

Causas genéticas autosómicas dominantes		
Gen	Proteína	Función proteína
PARK1	$\alpha$ -sinucleína	Tráfico vesículas sinápticas Captación ácidos grasos poliinsaturados
PARK5	UCHL1	Desubiquitinasa. Sistema ubiquitina-proteasoma (eliminación agregados proteicos)
PARK8	LRRK2	Proteína con actividades quinasa y GTPasa. Participa además en uniones proteína-proteína. Implicada en tráfico vesicular, autofagia y crecimiento de las neuritas.
PARK11	GIGYF2	Señalización mediada por receptores de insulina y factores de crecimiento insulin-like (IGFs)
PARK13	HTRA2	Serina proteasa mitocondrial. Coopera con Parkin y PINK1 en procesos de mitofagia
PARK17	VPS35	Implicada en transporte retrógrado de proteínas entre endosomas y trans-Golgi
PARK18	EIF4G1	Forma parte del factor de iniciación de la traducción 4F. Regula la iniciación de la traducción del mRNA mitocondrial
PARK21	TMEM230	Proteína transmembrana de vesículas secretoras (vesículas sinápticas) y de reciclamiento (endosomas)
PARK22	CHCHD2	Localizada en el espacio intermembrana. Implicada en apoptosis, metabolismo, fosforilación oxidativa y migración neuronal
RIC3	RIC3	Chaperona de la subunidad $\alpha$ -7 del receptor nicotínico de acetilcolina.
Causas genéticas autosómicas recesivas		
PARK2	Parkin	E3 ubiquitina ligasa. Implicada en la degradación selectiva de mitocondrias mediante autofagia
PARK6	PINK1	Proteína quinasa mitocondrial. Implicada en la degradación selectiva de mitocondrias mediante autofagia
PARK7	DJ-1	Peptidasa localizada en el citosol, en la mitocondria y en el núcleo. Participa en la degradación selectiva de mitocondrias.
PARK9	ATP13A2	Proteína transmembrana del lisosoma. Interacciona con ácido fosfatídico e inositol (3,5) bisfosfato regulando la llegada de cargo a los lisosomas.
PARK14	PLA2G6	Fosfolipasa A2 independiente de calcio. Produce lisofosfolípidos y ácidos grasos libres que regulan distintos procesos como la autofagia, la peroxidación lipídica o la función mitocondrial
PARK15	FBXO7	Actúa como adaptador de la E3 ubiquitina ligasa SCF facilitando la ubiquitinación de distintas proteínas.
PARK19	DNAJC6	Se expresa selectivamente en neuronas. Participa en la endocitosis mediada por clatrina de distintas proteínas como el receptor de dopamina.
PARK20	SYNJ1	Fosfoinosítido fosfatasa. Participa en el reciclamiento post-endocítico de vesículas sinápticas.
PARK23	VPS13C	Localizada en la membrana externa mitocondrial. Implicada en la funcionalidad mitocondrial y en la regulación de la mitofagia mediada por Parkin/PINK1

**Tabla 2: Causas monogénicas de enfermedad de Parkinson.** ATP13A2: ATPase Cation Transporting 13A2. CHCHD2: Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 2. DJ-1: Protein deglycase DJ-1. DNAJC6: DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C6. EIF4GI: Eukaryotic translation initiation factor 4GI. FBXO7: F-Box Protein 7. GIGYF2: GRB10-interacting GYF protein 2. HTRA2: Serine protease HTRA2. LRRK2: Leucine-rich repeat kinase 2. PINK1: PTEN-induced kinase 1. PLA2G6: Phospholipase A2 Group VI. RIC3: RIC3 acetylcholine receptor chaperone. SYNJ1: Synaptojanin 1. TMEM230: Transmembrane protein 230. VPS13C: Vacuolar Protein Sorting 13 Homolog C.

## Introducción



**Figura 5: Circuitos neuronales afectados en la enfermedad de Parkinson.** Se muestran dos planos axiales del cerebro humano indicando el midbrain y la substantia nigra (en el plano inferior) y el estriado (en el plano superior). A la derecha se muestran las proyecciones de la substantia nigra que llegan al estriado y la disminución de las mismas que tiene lugar en la enfermedad de Parkinson. Tomado de (Broski, Hunt et al. 2014).

Diversos estudios han demostrado que la proteína LRRK2 regula a la autofagia (Alegre-Abarregui, Christian et al. 2009) (figura 6).

En este trabajo se pone de manifiesto un papel inhibitorio de la proteína LRRK2 sobre autofagia. Por otro lado, las mutaciones de la proteína LRRK2 afectan a la actividad autofágica mediante el incremento de su actividad quinasa (Tagliaferro, Kareva et al. 2015). Además de los efectos sobre macroautofagia, las mutaciones de LRRK2 afectan a la autofagia mediada por chaperonas. Se ha descrito que LRRK2 es degradada en el lisosoma mediante este proceso (Orenstein, Kuo et al. 2013). La unión de LRRK2 a la proteína lisosomal LAMP2A (Lysosome-Associated Membrane Protein 2) se ve incrementada por el aumento de otros sustratos de esta proteína impidiendo su degradación (Orenstein, Kuo et al. 2013).

Otras mutaciones que causan Parkinson familiar y que afectan a la autofagia y a la función de los lisosomas son las que se producen en el gen SYNJ1 (sinaptojanin 1) (figura 6). Se ha descrito que la proteína sinaptojanin 1 es necesaria para la maduración de los autofagosomas (Vanhauwaert, Kuenen et al. 2017), y que mutaciones de este gen impiden el reclutamiento de la proteína WIPI2 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2) y la lipidación de LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) (Krebs, Karkheiran et al. 2013). Por último, mutaciones en Parkin y PINK1 (PTEN Induced Kinase 1) desregulan la degradación selectiva mediante autofagia de las mitocondrias (figura 6).

Las proteínas LRRK2 y synaptojanin 1 también actúan regulando el tráfico sináptico (figura 6). Esto se debe a interacciones de estas proteínas con proteínas sinápticas. LRRK2 interactúa con las proteínas sinaptofisina, VAMP2 (Vesicle Associated Membrane Protein 2) y sinapsina I presentes en la membrana de las vesículas sinápticas

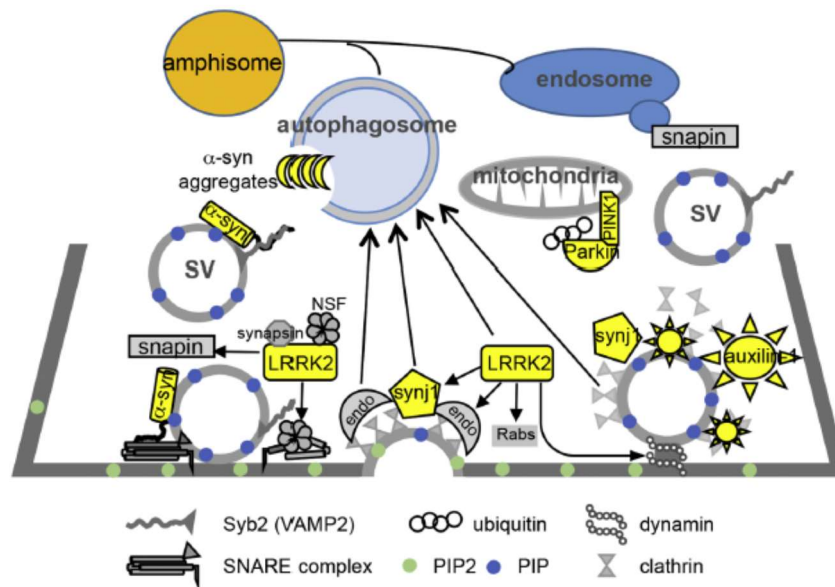
## Introducción

(Shin, Jeong et al. 2008, Cîrnaru, Marte et al. 2014). Por otro lado, las proteínas sinaptojanin 1 y auxilin (codificada por el gen DNAJC6 - DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C6) están implicadas en la endocitosis mediada por clatrina de las vesículas sinápticas (Cremona, Di Paolo et al. 1999, Yim, Sun et al. 2010).

El tráfico y el metabolismo lipídico son otros procesos celulares que se encuentran alterados en esta enfermedad. Estas alteraciones se deben mayoritariamente a formas aberrantes de  $\alpha$ -sinucleína y a la agregación proteica (figura 7).

En los últimos años, diversos estudios han demostrado que las formas aberrantes de  $\alpha$ -sinucleína se unen a especies lipídicas concretas, lo que refuerza las interacciones de esta proteína con membranas sinápticas, favorece su oligomerización y agregación (Galvagnion 2017) e interfiere con la actividad catalítica de enzimas modificadoras de lípidos (Badawy, Okada et al. 2018, Conde, Alza et al. 2018) (figura 7).

Por otro lado, se ha demostrado que  $\alpha$ -sinucleína regula la captación y el metabolismo de distintas clases lipídicas. La deficiencia de esta proteína inhibe la captación de ácido palmítico y ácido araquidónico (AA). Además, se incrementa la captación de ácido docosahexaenoico (DHA) y su incorporación a fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS) y disminuyen los niveles de cardiolipina (CL) y fosfatidilglicerol (PG) en las membranas mitocondriales. Por último, las formas mutadas de  $\alpha$ -sinucleína incrementan la actividad de la enzima Acil-CoA sintetasa lo que se traduce en un aumento de los niveles de TAG (Alecú I Bennett SAL 2019) (figura 7).



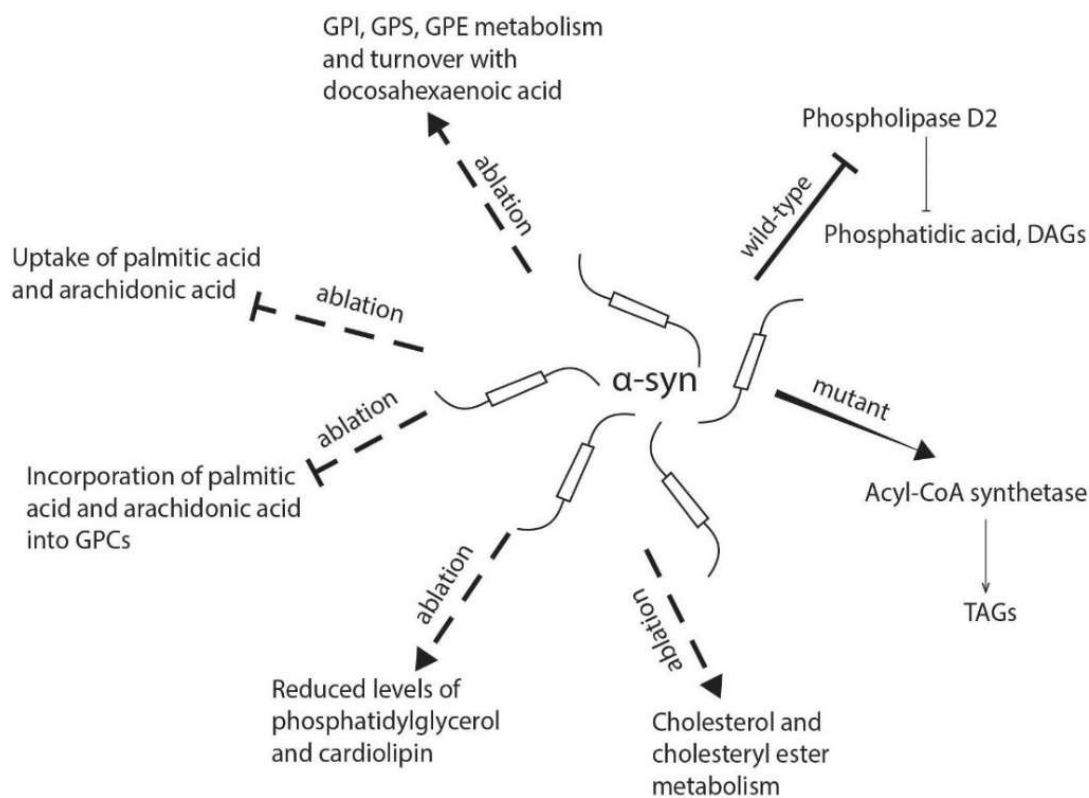
**Figura 6: Relación entre proteínas codificadas por genes mutados en la enfermedad de Parkinson y el tráfico sináptico.** Se indican los efectos de las proteínas LRRK2, sinaptojanina 1, auxilina,  $\alpha$ -sinucleína, Parkin y PINK1.  $\alpha$ -syn:  $\alpha$ -sinucleína. LRRK2: Leucine-rich repeat kinase 2. PIP: Fosfatidilinositol fosfato. PIP2: Fosfatidilinositol bisfosfato. SV: Vesícula sináptica. synj1: Synaptojanin 1. VAMP2: Vesicle Associated Membrane Protein 2. Tomado de (Pan, Zhu et al. 2019).

## Introducción

Además de los efectos de  $\alpha$ -sinucleína sobre el tráfico y metabolismo lipídico, la mutación en genes que codifican para enzimas modificadoras de lípidos, como la fosfolipasa A2 de grupo 6 (PLA2G6) son los causantes de casos familiares de la enfermedad (Feresé, Scala et al. 2018). Por último, la mutación de genes que codifican para enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, como las que ocurren en el gen GBA incrementan el riesgo de padecer la enfermedad (Gegg and Schapira 2018).

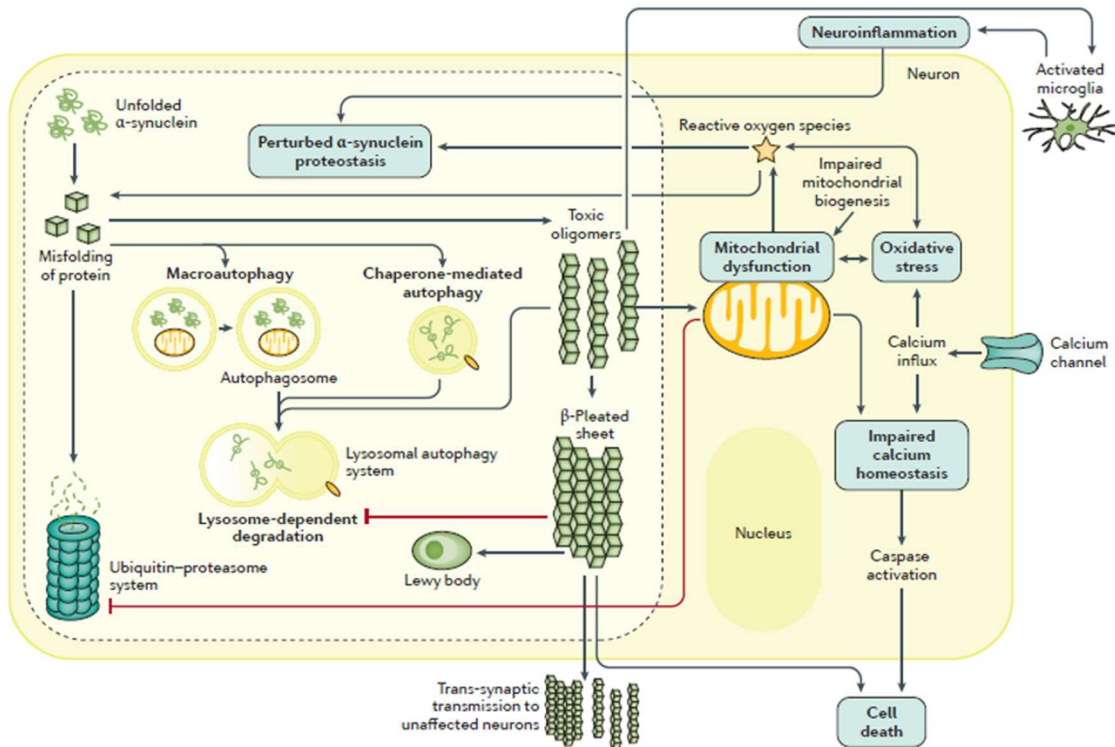
Otros efectos deletéreos causados por la agregación proteica y la formación de los cuerpos de Lewy son la disfunción mitocondrial, lo que aumenta el estrés oxidativo, o el incremento de la respuesta inflamatoria causada por la activación microglial y astrogial (Poewe, Seppi et al. 2017) (figura 8).

Las alteraciones a nivel mitocondrial son causadas por desregulaciones de la función y de los procesos de síntesis/degradación y fusión/fisión mitocondrial. Al igual que para el resto de los procesos celulares afectados en la enfermedad, la agregación proteica altera el funcionamiento mitocondrial. En este sentido está descrito que formas aberrantes de la proteína  $\alpha$ -sinucleína inducen toxicidad mitocondrial (Ridler 2018). Además, la deficiencia de GBA altera el correcto funcionamiento de las mitocondrias (Hang, Thundiyil et al. 2015).



**Figura 7: Efectos de  $\alpha$ -sinucleína y de las formas mutadas de la misma sobre distintas clases lipídicas.**  $\alpha$ -syn:  $\alpha$ -sinucleína. DAGs: Diacilgliceroles. GPCs: Glicerofosfatidilcolinas. GPE: Glicerofosfatidiletanolamina. GPI: Glicerofosfatidilinositol. GPS: Glicerofosfatidilserina. TAG: Triacilglicerol. Tomado de (Alecú and Bennett 2019).

## Introducción



**Figura 8: Procesos bioquímicos alterados en la enfermedad de Parkinson.** En los recuadros azules se indican las alteraciones a nivel bioquímico que desencadenan la muerte neuronal. Tomado de (Poewe, Seppi et al. 2017).

Las alteraciones en los procesos de fusión/fisión y síntesis/degradación se deben fundamentalmente a mutaciones en los genes que codifican para las proteínas Parkin y PINK1. Como ya se ha comentado, las mutaciones en la proteína Parkin son una de las causas genéticas de la enfermedad de Parkinson. Parkin es una E3-ubiquitina ligasa (Kitada, Asakawa et al. 1998) que media la ubiquitinación de proteínas citosólicas para su degradación mediante el sistema ubiquitina-proteasoma. Además, en condiciones de daño mitocondrial Parkin ubiquitina proteínas mitocondriales que median la degradación de estos orgánulos mediante autofagia (Narendra, Tanaka et al. 2008). Por lo tanto, las mutaciones en Parkin desregulan el sistema ubiquitina-proteasoma, la autofagia y la funcionalidad mitocondrial que como se ha explicado son tres de los procesos bioquímicos alterados en la enfermedad de Parkinson.

### 2.1.4. Modelos animales

Al igual que para el resto de las enfermedades humanas, el estudio de las enfermedades neurodegenerativas requiere el uso de modelos animales mediante el tratamiento con distintos compuestos o la modificación genética. La validación última de los modelos de la enfermedad de Parkinson se lleva a cabo mediante comparación de los resultados obtenidos en el modelo animal frente a los obtenidos en muestras procedentes de humanos.

Una de las principales ventajas de los modelos animales en la enfermedad de Parkinson es que permiten el estudio de los primeros estadios (fase preclínica) de la



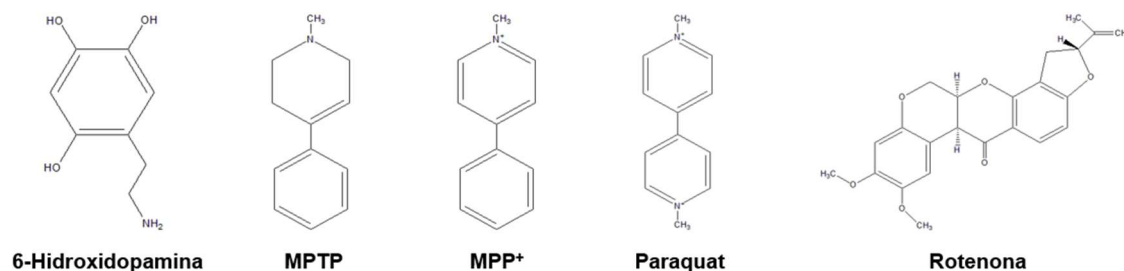
## Introducción

enfermedad. En estos modelos, se pueden estudiar las alteraciones que se producen en las regiones cerebrales afectadas y que conllevan la muerte de las neuronas dopaminérgicas.

En este punto, es importante destacar que hasta la fecha ninguno de los modelos animales utilizados para el estudio de la enfermedad de Parkinson recapitula todas las características bioquímicas y celulares ni todos los síntomas que definen a esta enfermedad en humanos.

Los modelos animales que se utilizan en el estudio de la enfermedad de Parkinson pueden dividirse en dos grupos: aquellos basados en el empleo de neurotoxinas y modelos genéticos. Los primeros se han utilizado de forma clásica para el estudio de la enfermedad de Parkinson esporádica, mientras que los segundos se centran en el estudio de los casos de enfermedad de Parkinson familiar.

Los modelos basados en el empleo de neurotoxinas se caracterizan por el tratamiento de los animales con distintos agentes neurotóxicos que inducen muerte de neuronas dopaminérgicas y que propician la aparición de cuadros parkinsonianos similares a los de pacientes humanos. Algunos de estos agentes han sido usados como pesticidas o herbicidas siendo los responsables de casos de enfermedad de Parkinson esporádica en humanos (Elbaz and Tranchant 2007, Hatcher, Pennell et al. 2008). En la figura 9 se muestra la estructura química de las neurotoxinas utilizadas en estos modelos.



**Figura 9: Estructura química de los compuestos utilizados para inducir cuadros sintomáticos similares a los de la enfermedad de Parkinson en modelos animales. MPP<sup>+</sup>: 1-methyl-4-phenylpyridinium. MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.**

Por otro lado, los modelos genéticos presentan menores tasas de degeneración dopaminérgica y, tradicionalmente, se han usado para caracterizar los cambios bioquímicos que se producen en los primeros estadios (fase preclínica) de la enfermedad.

La ausencia de degeneración dopaminérgica observada en los modelos genéticos puede deberse a varios factores, siendo uno de ellos el desarrollo de mecanismos de compensación en las neuronas de estos animales. Estos mecanismos se han descrito en modelos knock-out para Parkin (PK KO) donde están incrementados los niveles de glutathione reducido (Itier, Ibanez et al. 2003) o para DJ-1 donde los niveles de glutathione peroxidasa están aumentados (Andres-Mateos, Perier et al. 2007).

Para cerrar este apartado se explicará con más detalle el modelo animal utilizado en este trabajo. Se han utilizado ratones PK KO obtenidos por delección del exón 3 del gen que codifica para la proteína Parkin mediante recombinación homóloga. Este modelo fue generado por Itier et al. en 2003 y ha sido utilizado desde entonces como modelo de la enfermedad de Parkinson. En este artículo los autores describieron algunas de las

## Introducción

características bioquímicas, celulares y de comportamiento de este modelo de ratón (Itier, Ibanez et al. 2003). A nivel de morfología cerebral, estos ratones presentan cerebros con el mismo peso y tamaño que ratones WT. Además, no se observan cambios histológicos en el estriado, el hipocampo o el cerebelo y no se produce degeneración de neuronas dopaminérgicas o aparición de cuerpos de Lewy. En cuanto a la síntesis/degradación de dopamina, estos ratones no tienen alterados los niveles de la enzima Tirosina Hidroxilasa, ni en la SNc ni en el estriado, pero presentan un procesamiento anormal de este neurotransmisor que induce defectos en la transmisión sináptica glutamatérgica. A nivel de comportamiento, los ratones PK KO presentan un menor comportamiento exploratorio y no presentan alteración de la actividad motora tras la exposición a anfetaminas. Los autores describen mecanismos de compensación frente a estrés oxidativo en neuronas PK KO.

Este modelo ha sido utilizado en otros trabajos en los que se ha caracterizado el efecto del envejecimiento (Solano, Casarejos et al. 2008) y la interacción con otras proteínas implicadas en neurodegeneración como la proteína Tau (Menendez, Rodriguez-Navarro et al. 2006, Cummins, Tweedie et al. 2019),  $\alpha$ -sinucleína (Van Rompuy, Oliveras-Salva et al. 2015) o huntingtina (Rubio, Rodriguez-Navarro et al. 2009).

Al no existir degeneración dopaminérgica, este modelo no puede usarse para testar la eficacia de compuestos neuroprotectores. En cambio, ha sido utilizado para el estudio de los efectos de la delección de Parkin ante la exposición a herbicidas y pesticidas que causan Parkinson esporádico, así como para conocer los cambios a nivel bioquímico y celular que son causados por la ausencia de esta proteína (Casarejos, Menendez et al. 2006, Solano, Menendez et al. 2006, Solano, Casarejos et al. 2012). El trabajo de investigación que se ha llevado a cabo en esta tesis doctoral pertenece a este último grupo de estudios.

El modelo de ratón PK KO también ha permitido descubrir la relación existente entre esta proteína y el metabolismo lipídico. En este sentido, se ha descrito que Parkin modula la captación de ácidos grasos mediante la ubiquitinación de la proteína CD36 (Cluster of Differentiation 36, también conocida como, platelet glycoprotein 4) (Kim, Stevens et al. 2011). En otro estudio se demostró que la supresión de Parkin induce desregulaciones de los procesos de endocitosis mediados por lipid rafts que, en último término, favorecerían la transmisión célula-célula de  $\alpha$ -sinucleína (Cha, Choi et al. 2015). Por último, el empleo del modelo PK KO ha permitido caracterizar algunas de las funciones neuroprotectoras que tienen las células de glía (Solano, Casarejos et al. 2008).

## 2.2. Astrocitos en enfermedades neurodegenerativas

Las células de glía (astroglía, microglía y oligodendroglía) presentan diversas funciones imprescindibles para la homeostasis y el correcto funcionamiento del Sistema Nervioso Central. Estas células median procesos clave para el desarrollo del sistema nervioso, la transmisión sináptica y la plasticidad sináptica, entre otras funciones (Allen and Lyons 2018). Los astrocitos, que son el tipo mayoritario dentro de las células gliales, participan en la homeostasis de neurotransmisores (Eulenburg and Gomeza 2010), suplen



## Introducción

a las neuronas de metabolitos esenciales para estas células como la glutamina (Hertz and Zielke 2004) y liberan diversos factores neurotróficos como el GDNF o el BDNF (“Glial cell-line-Derived Neurotrophic Factor” y Brain-Derived Neurotrophic Factor” respectivamente) (Lin, Doherty et al. 1993, Parpura and Zorec 2010) entre otras funciones.

Además de las funciones homeostáticas, los astrocitos son capaces de “activarse” en respuesta a distintos daños en el cerebro. Esta activación de astrocitos y de células de microglía se conoce como gliosis reactiva y es una respuesta fisiológica encaminada a contener el daño y remover patógenos, debris celulares o agregados proteicos (agregados de proteínas Tau,  $\alpha$ -sinucleína o  $\beta$ -amiloide) con el fin de proteger a las neuronas (Sofroniew 2009, Burda and Sofroniew 2014).

Las enfermedades neurodegenerativas, además de caracterizarse por la muerte de poblaciones específicas de neuronas, también cursan con daños en las células de glía. Si bien tradicionalmente el estudio de las enfermedades neurodegenerativas se ha llevado a cabo desde una perspectiva “neurocéntrica” en la que toda la atención de la investigación se centraba en estudiar los daños producidos en las neuronas; actualmente cada vez hay más trabajos que estudian la desregulación que se produce a nivel de las células de glía.

La contribución de los astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas se asocia a la pérdida o alteración de las funciones homeostáticas de estas células y a la sobreactivación de la astrogliosis reactiva. Todas estas alteraciones en el funcionamiento fisiológico de los astrocitos contribuyen al inicio y a la progresión de estas enfermedades (Fellner, Jellinger et al. 2011, Halliday and Stevens 2011). Esto ha hecho que cambie el rol que juegan estas células en las enfermedades neurodegenerativas y que hayan pasado de ser consideradas como agentes pasivos de la muerte neuronal a ser objeto de numerosos estudios.

Las desregulaciones a nivel de las funciones homeostáticas de los astrocitos también se han observado en la enfermedad de Parkinson. Se ha descrito que la capacidad neuroprotectora de los astrocitos se reduce debido a la disminución de la liberación de factores neurotróficos. Además, se produce una sobreactivación de la respuesta inflamatoria (astrogliosis reactiva) y la proliferación de los astrocitos decae reduciendo la capacidad de responder ante situaciones de estrés (figura 10). Por último, disminuye la captación de glutamato por parte de estas células, lo que conlleva un aumento de sus niveles en la sinapsis (figura 10). Todos estos efectos contribuyen a la toxicidad neuronal y a la muerte de estas células (Booth, Hirst et al. 2017).

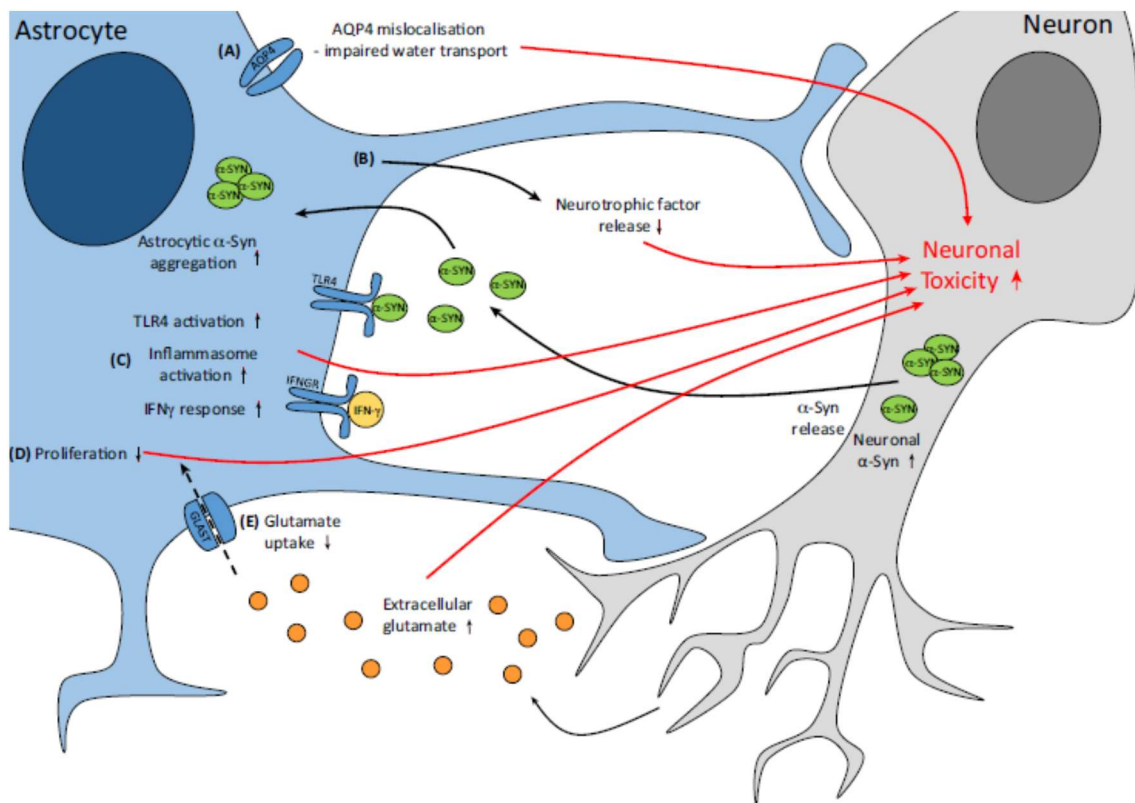
Además, los astrocitos son capaces de captar los agregados de  $\alpha$ -sinucleína con el fin de proteger a las neuronas dopaminérgicas. En este sentido, se ha demostrado que formas alteradas de  $\alpha$ -sinucleína liberadas por terminales axónicos neuronales al espacio intercelular pueden ser captadas por astrocitos (Braak, Sastre et al. 2007). En otro estudio in vitro se demostró que se produce transferencia de  $\alpha$ -sinucleína desde una línea celular de neuronas dopaminérgicas a astrocitos de rata (Lee, Suk et al. 2010). La captación de  $\alpha$ -sinucleína provoca la agregación de esta proteína en el interior de los astrocitos lo que altera el correcto funcionamiento de estas células. Entre otros efectos deletéreos, la agregación de  $\alpha$ -sinucleína actúa inhibiendo los procesos de autofagia (Winslow, Chen et

## Introducción

al. 2010, Xilouri and Stefanis 2011). La disfunción de los astrocitos provoca la pérdida de homeostasis necesaria para el correcto funcionamiento de las neuronas y, en consecuencia, una mayor muerte neuronal.

Además, la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en el interior de las células de glía sobreactiva la respuesta inflamatoria. Este incremento de la activación de astrocitos va asociada a una liberación descontrolada de distintas citoquinas y factores proinflamatorios que inducen daño a las neuronas colindantes (Zhang, Wang et al. 2005). En este sentido, se ha demostrado que la captación de  $\alpha$ -sinucleína por parte de astrocitos en cultivo promueve una respuesta inflamatoria de estas células (Lee, Suk et al. 2010). Además, en otro trabajo se demostró que la adición de  $\alpha$ -sinucleína extracelular a cultivos de astrocitos humanos induce un incremento en la producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Klegeris, Giasson et al. 2006).

Sin embargo, cuando se trasladan los resultados obtenidos en experimentos *in vitro* acerca de la sobreactivación astrogliar a muestras de pacientes humanos de la enfermedad de Parkinson los resultados no son tan consistentes. En distintos estudios se han reportado procesos de activación glial inexistentes, moderados o severos en muestras humanas de pacientes de la enfermedad de Parkinson (Mirza, Hadberg et al. 2000, Vila, Jackson-Lewis et al. 2001, Hirsch, Hunot et al. 2005).

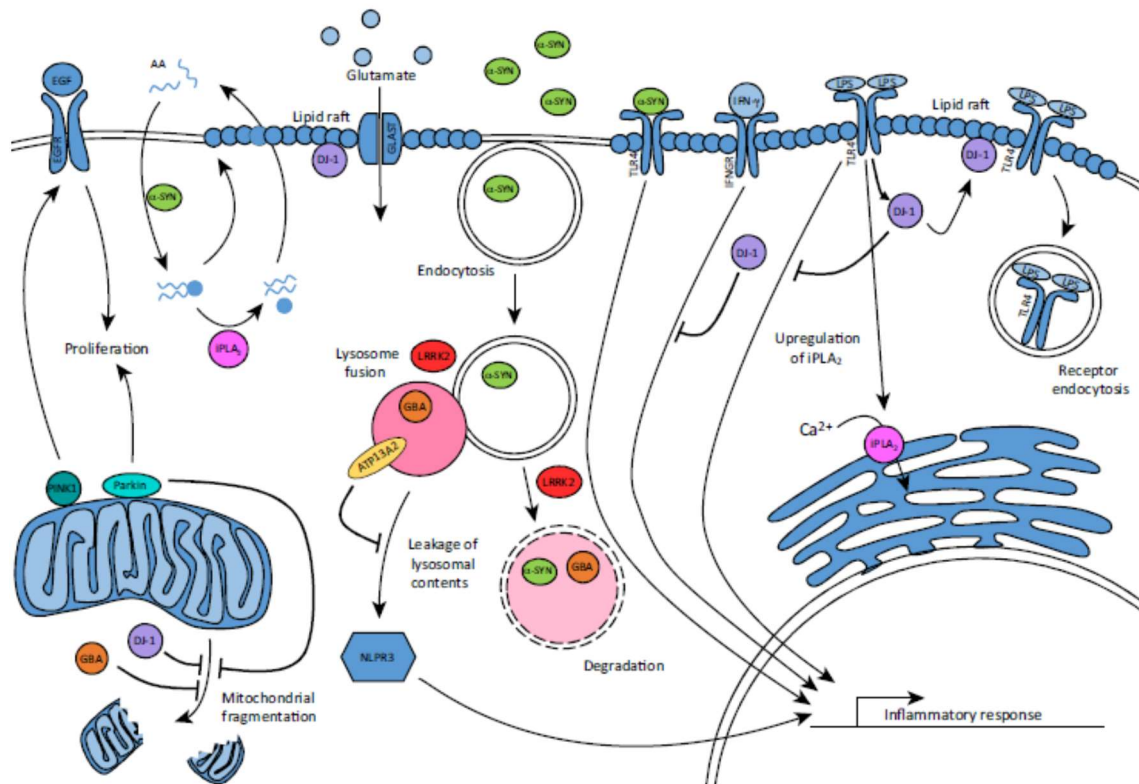


**Figura 10: La disfunción de los astrocitos contribuye al daño neuronal.** Se muestran distintos procesos celulares desregulados en los astrocitos en la enfermedad de Parkinson y sus efectos sobre las neuronas.  $\alpha$ -syn:  $\alpha$ -sinucleína. AQP4: Aquaporin 4. IFN $\gamma$ : Interferón gamma. TLR4: Toll Like Receptor 4. Tomado de (Booth, Hirst et al. 2017).

Se ha descrito que las proteínas codificadas por genes cuya mutación causa la enfermedad tienen numerosas funciones en los astrocitos (Figura 11). Entre otras

## Introducción

funciones, las proteínas Parkin, PINK1, GBA y DJ-1 están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial en astrocitos. Utilizando distintos modelos carentes o con menores niveles de Parkin se han descrito distintas funciones de esta proteína en astrocitos. Entre ellas se encuentran la protección frente a la muerte celular inducida por dopamina o  $H_2O_2$ , o la degradación de distintas proteínas susceptibles de formar agregados, como  $\alpha$ -sinucleína, mediante la ubiquitinación por Parkin (Solano, Casarejos et al. 2008, Solano, Casarejos et al. 2012). Además,  $\alpha$ -sinucleína regula la captación de ácidos grasos en estas células, DJ-1 está implicada en la estabilidad de los lipid rafts de la membrana plasmática y ATP13A2 (ATPase Cation Transporting 13A2) contribuye a mantener la estabilidad del lisosoma y a evitar la liberación al citosol de enzimas lisosomales (Booth, Hirst et al. 2017).

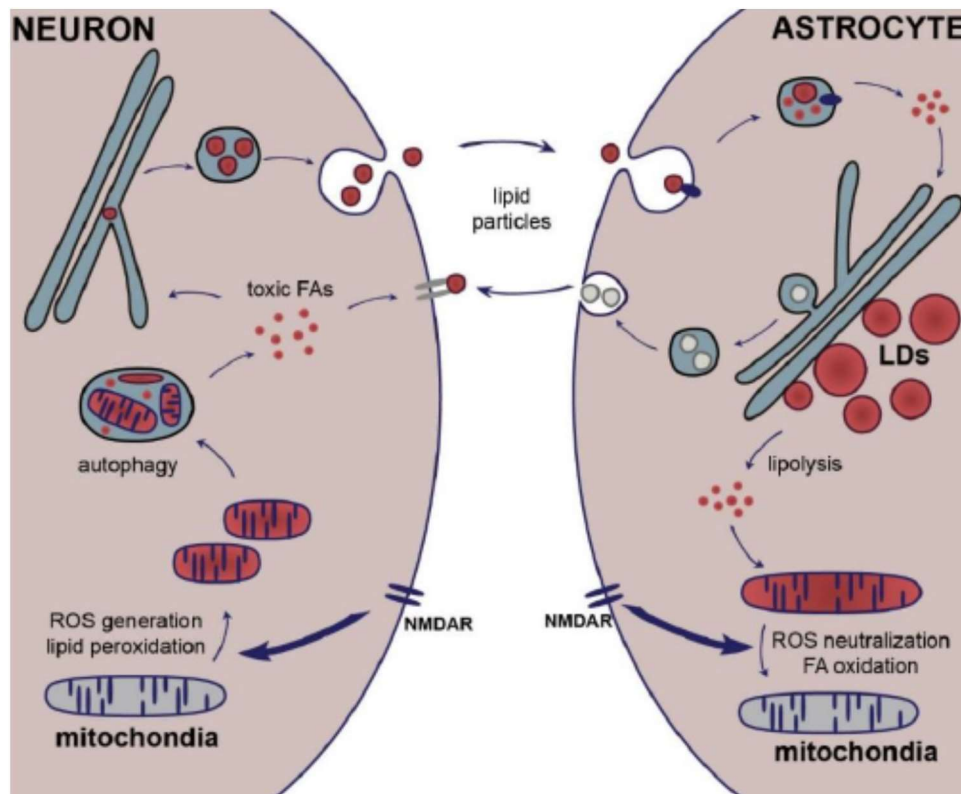


**Figura 11: Funciones en astrocitos de proteínas codificadas por genes mutados en la enfermedad de Parkinson.**  $\alpha$ -syn:  $\alpha$ -sinucleína. ATP13A2: ATPase Cation Transporting 13A2. DJ-1: Protein deglycase DJ-1. EGF: Epidermal Growth Factor. GBA: Glucocerebrosidase. iPLA2: intracelular Phospholipase A2. LRRK2: Leucine-rich repeat kinase 2. NLPR3: Inflammasome NLPR3. PINK1: PTEN Induced Kinase 1. Tomado de (Booth, Hirst et al. 2017).

Además del papel de los astrocitos en el aclaramiento de las formas aberrantes de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, se ha descrito que protegen a las neuronas mediante su participación en otros procesos como el metabolismo lipídico. Los astrocitos, a diferencia de las neuronas, presentan gotas lipídicas y metabolizan ácidos grasos en las mitocondrias para la obtención de energía (Schonfeld and Reiser 2013). En este sentido, se ha descrito que los astrocitos son capaces de captar lípidos oxidados (ácidos grasos peroxidados) generados por la actividad neuronal. Una vez captados, estos lípidos son neutralizados mediante su inclusión en gotas lipídicas y metabolizados en el interior de la mitocondria (Ioannou et al. 2018) (Figura 12). La alteración de éste y otros procesos del metabolismo

## Introducción

lipídico que tienen lugar en los astrocitos contribuyen al desarrollo de distintas enfermedades neurodegenerativas (Camargo, Brouwers et al. 2012, Liu, Zhang et al. 2015, Morita, Ikeshima-Kataoka et al. 2019).



**Figura 12: Acoplamiento del metabolismo lipídico entre neuronas y astrocitos.** En situaciones de elevada actividad neuronal se generan ácidos grasos oxidados que son captados por los astrocitos para su degradación protegiendo de esta forma a las neuronas. FA: Ácidos grasos. LDs: Gotas Lipídicas. NMDAR: Receptor N-metil-D-aspartato. ROS: Especies Reactivas de Oxígeno. Tomado de (Ioannou et al. 2018).

## 2.3. Autofagia

El correcto funcionamiento de las células y tejidos del organismo requiere la homeostasis de los distintos componentes intracelulares. Esta homeostasis se logra mediante la actuación coordinada de los procesos de síntesis de biomoléculas y orgánulos, y la degradación de componentes intracelulares “obsoletos” o dañados. Los principales mecanismos encargados de la eliminación de componentes intracelulares son la degradación mediante el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia.

El sistema ubiquitina-proteasoma lleva a cabo la degradación de proteínas de vida media corta en el proteasoma mediante su marcaje con moléculas de ubiquitina, mientras que la autofagia lleva a cabo la eliminación de diferentes componentes intracelulares (proteínas de vida media larga, orgánulos subcelulares, agregados proteicos) en el interior de los lisosomas (figura 13).

## Introducción

La autofagia tiene dos funciones principales que son la degradación de componentes intracelulares con el objetivo de obtener energía y de componentes y orgánulos disfuncionales (Mizushima, Yoshimori et al. 2011). Dentro de los procesos autofágicos se reconocen tres tipos principales que se diferencian en los mecanismos implicados en la llegada de los componentes intracelulares al interior de los lisosomas para su degradación. Estos tres tipos de autofagia son la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas (CMA) y la macroautofagia (Figura 13).

En la microautofagia los componentes intracelulares entran en los lisosomas mediante invaginaciones de su membrana. Mediante este proceso se degradan proteínas y pequeñas zonas de citosol (Li, Li et al. 2012). En segundo lugar, la CMA degrada proteínas que presentan una secuencia específica de aminoácidos (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln; KFERQ) que es reconocida por la chaperona citosólica Hsc70 (Heat shock 70 kDa protein). Estas proteínas son reconocidas por complejos formados por la proteína LAMP2A presente en la membrana lisosomal y se translocan a su interior donde son degradadas. Por lo tanto, mediante este proceso se degradan proteínas concretas que presentan el motivo KFERQ (Cuervo and Dice 1996). Por último, la macroautofagia, a partir de ahora se nombrará este proceso como autofagia, media la degradación en lisosomas de proteínas, orgánulos subcelulares y agregados proteicos mediante su incorporación a orgánulos transitorios de doble membrana conocidos como autofagosomas (Klionsky and Emr 2000). La autofagia puede ser no selectiva (degradación de material citoplásmico en condiciones de estrés) o selectiva (degradación mediante autofagia de orgánulos disfuncionales o agregados proteicos que han sido previamente marcados para su degradación). Dentro de la autofagia selectiva se habla de distintos tipos en función del orgánulo/agregado proteico que es degradado (mitofagia, peroxifagia, agrefagia, lipofagia...).

### 2.3.1. Proteínas ATG y progresión de las distintas fases.

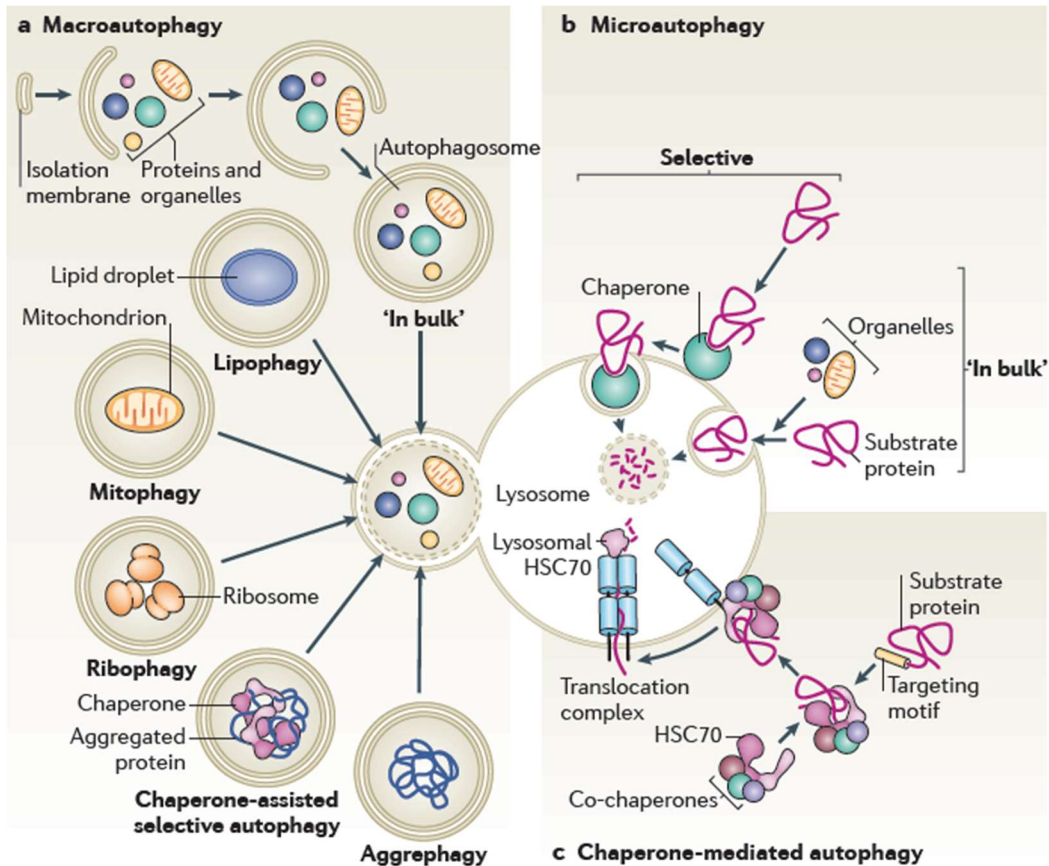
La autofagia ha sido un proceso celular largamente estudiado desde su descubrimiento en la década de los 60 del pasado siglo (Moe and Behnke 1962). El descubrimiento de los genes implicados en la autofagia en levaduras (Tsukada and Ohsumi 1993), conocidos como genes ATG (AuTophagy related genes) ha permitido conocer numerosos aspectos de la regulación de la autofagia y de los procesos que median la generación de los autofagosomas, el reconocimiento del cargo a degradar, el transporte de los autofagosomas desde el lugar de síntesis hasta los lisosomas o la fusión entre las membranas de estos dos orgánulos (Yu, Chen et al. 2018). En la actualidad, se conocen 42 genes ATG, de los cuales 16 se reconocen como “centrales” ya que son usados tanto en procesos de autofagia selectiva como no selectiva (Mizushima 2018) (Tabla 3).

Los genes ATG codifican para proteínas que regulan la autofagia principalmente mediante la formación de complejos proteicos. Generalmente, se reconocen seis complejos proteicos formados por proteínas codificadas por los genes ATG: Complejo quinasa ATG1/ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1), vesículas con mATG9, fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III (PI3KCIII), complejo ATG2-ATG18 y sistemas de conjugación “Ubiquitin-like” (complejo ATG12-ATG5-ATG16 y complejo LC3). La



## Introducción

actuación de estos seis complejos proteicos permite la progresión de las distintas fases de la autofagia.



**Figura 13: Tipos principales de autofagia.** Dentro de la macroautofagia se muestran distintos tipos en función del material intracelular a degradar. HSC70: Heat shock 70 kDa protein. Tomado de (Cuervo 2011).

Se conocen cinco fases distintas en los procesos de autofagia: Inducción, nucleación, expansión del fagóforo (precursor del autofagosoma), fusión con la membrana de los lisosomas y, por último, degradación del cargo y reciclaje del autofagosoma.

La autofagia se activa en respuesta a diferentes condiciones ambientales, principalmente condiciones de ayuno y falta de nutrientes, que son reconocidas en el interior de la célula por el complejo mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin 1). En condiciones basales, mTORC1 inhibe la autofagia, pero en ausencia de nutrientes es inactivado mediante fosforilación, lo que estimula la autofagia mediante fosforilación del complejo proteico Atg1/ULK1 (ULK1 es el homólogo en mamíferos de la proteína de levaduras Atg1) (Kim, Kundu et al. 2011). El complejo Atg1/ULK1 está formado por la serina-treonina quinasa ULK1, FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa), ATG13 y ATG101. Este complejo actúa reclutando a otras proteínas ATG al sitio de formación del fagóforo (PAS, por sus siglas en inglés) (Papinski, Schuschnig et al. 2014).

## Introducción

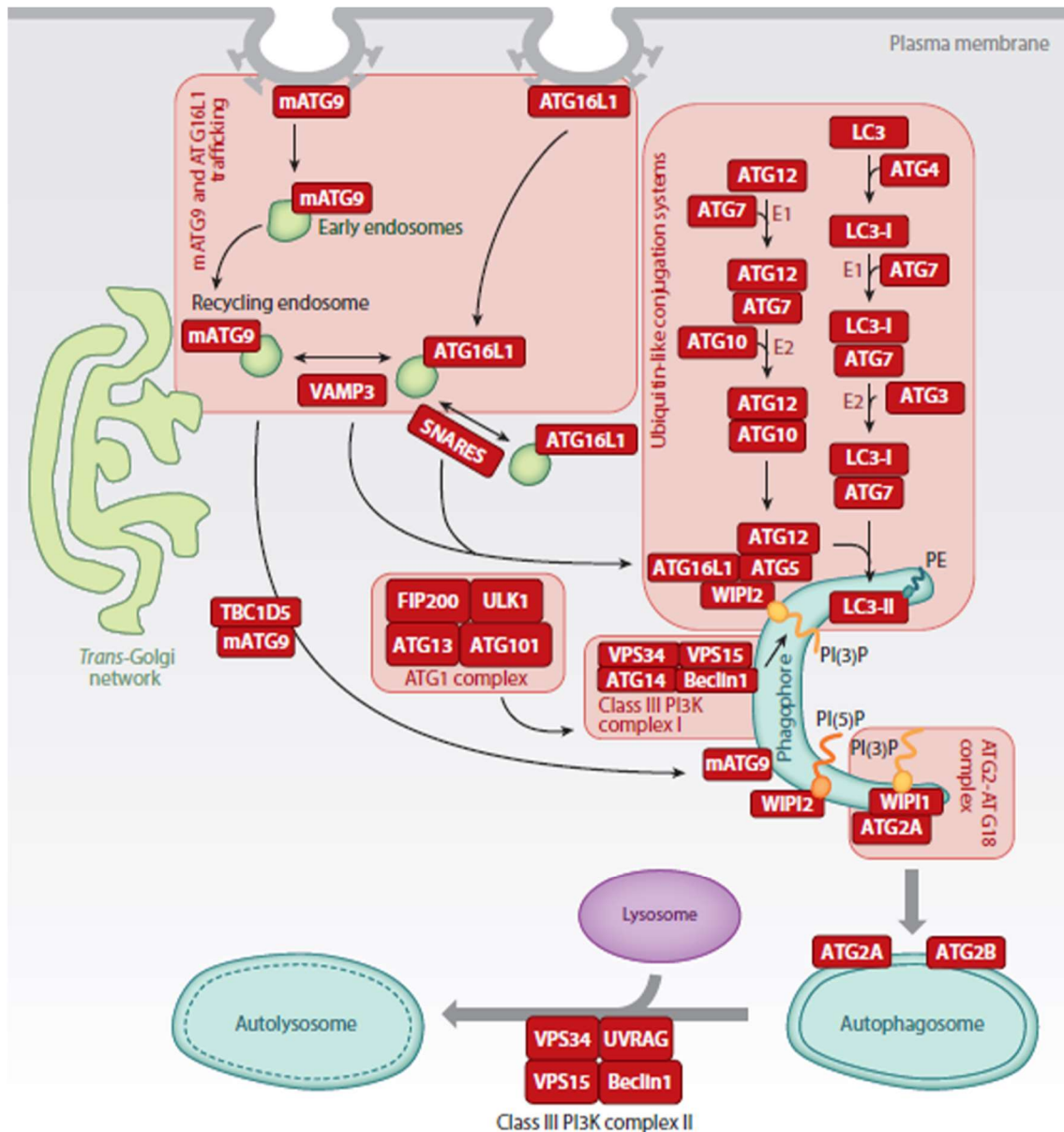
Mamíferos	Levaduras	Función
<b>ULK1, 2</b>	Atg1	Proteína quinasa del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200
<b>ATG2A, B</b>	Atg2	Parte del complejo AT2-WIPI que recluta mATG9
<b>ATG3</b>	Atg3	Enzima “E2-ubiquitina ligasa like” para la lipidación de LC3
<b>ATG4A, B, C, D</b>	Atg4	Proteasas implicadas en la activación y deslipidación de LC3
<b>ATG5</b>	Atg5	Enzima “E3-ubiquitina like” del complejo ATG12-ATG5-ATG16 implicada en la lipidación de LC3
<b>Beclin 1</b>	Atg6	Parte del complejo PI3K de clase III
<b>ATG7</b>	Atg7	Enzima “E1-ubiquitina ligasa like” en los complejos ATG12-ATG5-ATG16 y complejo LC3
<b>LC3 A, B, C; GABARAPs GATE-16</b>	Atg8	Proteínas “Ubiquitin-like” que se lipidan mediante su unión a LC3
<b>mATG9</b>	Atg9	Proteína transmembrana implicada en la transferencia de membrana al fagóforo
<b>ATG10</b>	Atg10	Enzima “E2-ubiquitina ligasa like” en los complejos ATG12-AT5-ATG16
<b>ATG12</b>	Atg12	Proteína “Ubiquitin-like” en el complejo ATG12-ATG5-ATG16
<b>ATG13</b>	Atg13	Parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200 y que es diana de mTORC1
<b>ATG14L</b>	Atg14	Parte del complejo PI3K de clase III
<b>ATG16L1, 2</b>	Atg16	Se une al complejo ATG12-ATG5 y se postula que marca sitios de lipidación de LC3 en las membranas del autofagosoma
<b>FIP200</b>	Atg17	Parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200
<b>WIPI-1, 2, 3</b>	ATG18	Parte del complejo ATG2-WIPI necesario para el reclutamiento de mATG9 a la membrana de los autofagosomas
<b>ATG101</b>	nd	Parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200

**Tabla 3: Proteínas ATG implicadas en la formación del autofagosoma en mamíferos y levaduras.** FIP200: FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa. LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3. mTORC1: mammalian Target of Rapamycin Complex 1. PI3K: phosphoinositide-3-kinase. ULK: Unc-51 like autophagy activating kinase. WIPI: WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides. Adaptado de (Bento, Renna et al. 2016).

El reclutamiento de distintas proteínas por acción del complejo ULK1 se conoce con el nombre de nucleación. Uno de los complejos que es reclutado al PAS por acción de la actividad quinasa del complejo ULK1 es PI3KCIII. Este complejo fosforila al PI en posición 3 para formar fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) y está formado por las proteínas Beclin 1, VPS34 (Vacuolar Protein Sorting 34), VPS15 ((Vacuolar Protein Sorting 15) y ATG14 (Schu, Takegawa et al. 1993). El PI3P producido en el PAS permite el reclutamiento de distintas proteínas que presentan motivos de unión a este fosfoinosítido.

## Introducción

Entre ellas se encuentran las proteínas ATG18 y ATG12 que permiten el reclutamiento de las proteínas LC3, mATG9 y ATG12 al PAS (Obara, Sekito et al. 2008) (figura 14).



**Figura 14: Complejos proteicos implicados en las distintas fases de la autofagia.** Se muestran las distintas fases de la autofagia y la localización subcelular en la que actúan. PI(3)P: Fosfatidilinositol 3 fosfato. PI(5)P: Fosfatidilinositol 5 fosfato. SNARE: SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor. VAMP3: Vesicle Associated Membrane Protein 3. VPS15: Vacuolar Protein Sorting 15. VPS34: Vacuolar Protein Sorting 34. Tomado de (Bento, Renna et al. 2016).

La siguiente fase de la autofagia, elongación del fagóforo, requiere la participación de la proteína mATG9 y de los dos complejos “Ubiquitin-like” formados por ATG12-ATG5-ATG16 y por LC3, y consiste en la expansión de la membrana del fagóforo mediante la incorporación de lípidos de diferentes fuentes intracelulares (figura 14).



## Introducción

La proteína mATG9 es la única proteína transmembrana necesaria para la fase de elongación (Orsi, Razi et al. 2012) y se postula que actúa formando parte de vesículas que se fusionan con la membrana del PAS permitiendo la incorporación de lípidos a estas membranas (Yamamoto, Kakuta et al. 2012) (figura 14). Se atribuye este papel a la proteína mATG9 ya que presenta una gran movilidad en condiciones de activación de la autofagia (Yamamoto, Kakuta et al. 2012) y es capaz de translocarse entre membranas subcelulares como la de las mitocondrias y el PAS (Reggiori, Shintani et al. 2005).

Por otro lado, los complejos “Ubiquitin-Like” permiten el reclutamiento de proteínas al PAS (Ohsumi 2001), entre ellas la proteína LC3 que queda anclada a la membrana del autofagosoma hasta su fusión con los lisosomas y se usa, por lo tanto, como marcador de este orgánulo subcelular. Estos complejos actúan de forma análoga a aquellos que unen ubiquitina a las proteínas que van a ser degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma. Es por ello que se habla de las proteínas ATG12 y LC3 como proteínas “Ubiquitin-like”. En el complejo ATG12-ATG5-ATG16, la proteína ATG7 actúa como una E1-ubiquitina ligasa activando a la proteína ATG12. Una vez activada, la proteína ATG12 es reconocida por la proteína ATG10 que actúa como una E2-ubiquitina ligasa permitiendo la conjugación de ATG12 a la proteína ATG5. Finalmente, el complejo formado por las proteínas ATG12-ATG5 se une a la proteína ATG16 (figura 14). Por otro lado, en el complejo de LC3 la primera reacción que tiene lugar es el corte proteolítico de esta proteína por acción de la proteasa ATG4B (Sugawara, Suzuki et al. 2005). Tras este corte proteolítico, LC3 sufre la actuación de las proteínas ATG7 (Noda, Satoo et al. 2011), ATG3 (Taherbhoy, Tait et al. 2011) y del complejo ATG12-ATG5-ATG16 (Hanada, Noda et al. 2007) que participan como ubiquitina ligasas 1, 2 y 3 respectivamente (figura 14). La actuación de estas proteínas sobre LC3 permite su lipidación mediante unión a PE y su anclaje a la membrana del PAS.

La actuación de todos estos complejos permite el cierre de las membranas del PAS formándose el autofagosoma que engloba el material intracelular a degradar en los lisosomas. La siguiente fase consiste en la movilización de los autofagosomas en el citosol para que lleguen a los sitios donde se encuentran los lisosomas. En la actualidad, no se conocen con exactitud todos los procesos implicados en el transporte de autofagosomas y su fusión con los lisosomas, aunque en los últimos años se han llevado a cabo importantes avances en el esclarecimiento de estas cuestiones. Por ejemplo, se ha descrito que el tráfico de autofagosomas se lleva a cabo sobre microtúbulos de actina presentes en el citosol (Monastyrska, Rieter et al. 2009) o que se requiere la ruptura de la unión entre LC3 y PE mediada por la proteasa ATG4B para evitar la fusión prematura de las membranas del autofagosoma y del lisosoma (Nair, Yen et al. 2012).

La última fase de la autofagia consiste en la fusión entre la membrana externa del autofagosoma y la membrana del lisosoma que permite la descarga del material intracelular a degradar (también se degrada la membrana interna del autofagosoma). Para llevar a cabo esta fusión se requiere la actuación de distintas proteínas como las (RAB Ras-associated binding) GTPasas o las proteínas SNAREs (SNAP [Soluble NSF Attachment Protein] Receptor). Las proteínas RAB actúan reclutando efectores específicos necesarios para el movimiento de vesículas hacia su destino y para la fusión de membranas (en este caso el movimiento de autofagosomas hasta llegar a los lisosomas

## Introducción

y la fusión de las dos membranas) (Stenmark 2009). Dentro de las distintas RAB GTPasas, se ha implicado a la proteína RAB7 en la fusión de las membranas de los autofagosomas y los lisosomas (Pankiv, Alemu et al. 2010). Dentro de los complejos SNARE, se ha visto que TECPR1 (Tectonin Beta-Propeller Repeat Containing 1) se localiza en autofagosomas maduros y que su delección provoca una acumulación de autofagosomas (Chen, Fan et al. 2012).

### 2.3.2. Degradación selectiva de mitocondrias (mitofagia)

Los procesos necesarios para la progresión de la autofagia explicados en el apartado anterior son comunes para procesos de autofagia no selectiva y selectiva. Sin embargo, en los procesos de autofagia selectiva actúan proteínas adicionales que marcan a los contenidos intracelulares que van a ser degradados por autofagia.

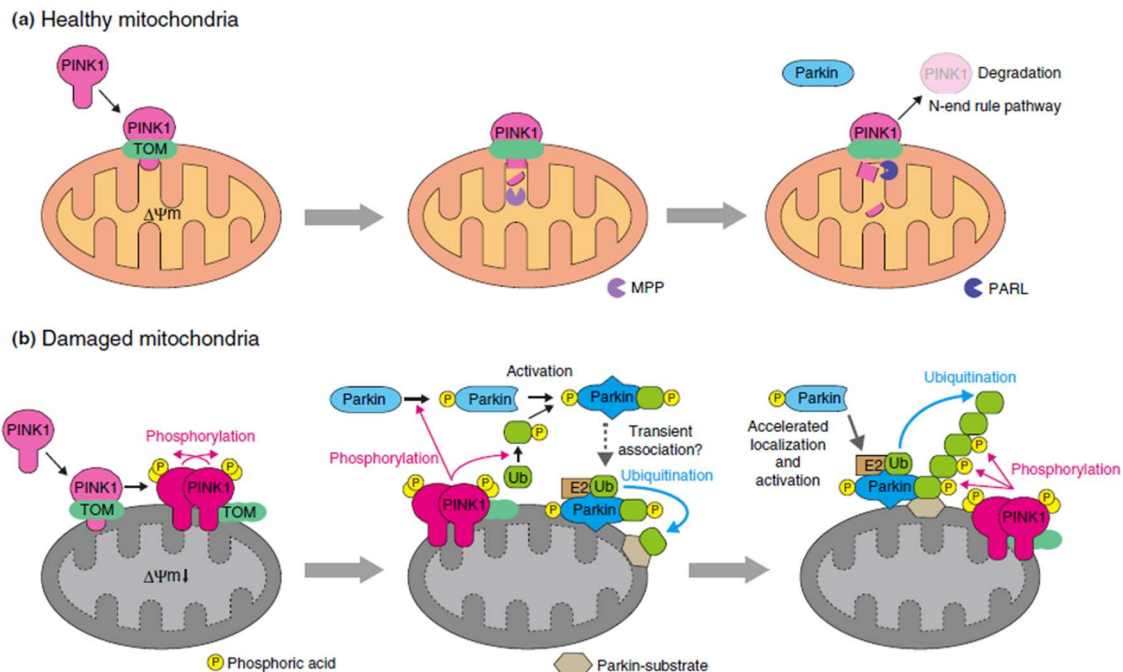
Dentro de los tipos selectivos de autofagia uno de los más estudiados es la mitofagia dependiente de Parkin. Mediante este proceso se degradan mitocondrias dañadas por distintos tipos de estrés y que, por lo tanto, tienen un funcionamiento anómalo generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y otras moléculas dañinas (Ashrafi and Schwarz 2013, Jin and Youle 2013).

La proteína Parkin es una E3-ubiquitina ligasa citosólica que es capaz de translocarse a la membrana externa de mitocondrias dañadas (Narendra, Tanaka et al. 2008). Esta translocación requiere la participación de la proteína quinasa PINK1 (Narendra, Jin et al. 2010). En condiciones basales, la proteína PINK1 tiene una vida media muy corta ya que es eliminada tras corte proteolítico mediado por la proteína PARL (Presenilins-associated rhomboid-like protein) (Deas, Plun-Favreau et al. 2011) (figura 15). Sin embargo, en situaciones de daño mitocondrial, tras incubación con el protonóforo CCCP (Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhenyl-hydrazine), la quinasa PINK1 se estabiliza en la membrana externa mitocondrial lo que sirve como señal para el reclutamiento de la proteína Parkin. PINK1 actúa fosforilando a la proteína Parkin, a sí misma y a otras proteínas de la membrana externa mitocondrial (Iguchi, Kujuro et al. 2013, Okatsu, Uno et al. 2013, Kane, Lazarou et al. 2014) (figura 15). Una vez fosforilada, Parkin actúa ubiquitinando proteínas de la membrana externa mitocondrial (Sarraf, Raman et al. 2013, Trempe, Sauve et al. 2013) (figura 15). El marcaje por ubiquitina media la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasoma pero también actúa como señal de reclutamiento de la maquinaria autofágica (Narendra, Tanaka et al. 2008, Sarraf, Raman et al. 2013). Este reclutamiento se lleva a cabo mediante la actuación de diversas proteínas adaptadoras como p62, Optineurin o NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1 protein) (Kirkin, Lamark et al. 2009, Geisler, Holmstrom et al. 2010, Wong and Holzbaur 2014). El reclutamiento de la maquinaria autofágica permite encerrar la mitocondria a degradar en el interior del autofagosoma y transportarla al lisosoma para su degradación.

Aunque la mitofagia dependiente de Parkin se describió en un modelo de daño mitocondrial inducido por CCCP (Narendra, Tanaka et al. 2008), se conoce que este proceso también está activo en condiciones basales y en otras condiciones de estrés mitocondrial. Se ha descrito la importancia de los procesos de mitofagia en situaciones de ayuno (Mukhopadhyay, Naik et al. 2016), en el desarrollo de eritrocitos (Sandoval,

## Introducción

Thiagarajan et al. 2008), y en la herencia materna del DNA (Ácido desoxirribonucleico) mitocondrial mediante la degradación por mitofagia de las mitocondrias de los espermatozoides (Al Rawi, Louvet-Vallee et al. 2011, Sato and Sato 2011).



**Figura 15: Mitofagia dependiente de Parkin.** En ausencia de daño mitocondrial Parkin se localiza en el citoplasma y PINK1 es degradada. Ante una situación de daño mitocondrial, PINK1 se estabiliza y Parkin se transloca a la membrana externa mitocondrial donde ubiquitina proteínas mitocondriales que sirven para el marcaje del orgánulo dañado para su degradación mediante autofagia. P: Fosfato. PINK1: PTEN Induced Kinase 1. TOM: Translocase of the outer membrane. Ub: Ubiquitina. Tomado de (Eiyama and Okamoto 2015).

La mitofagia dependiente de Parkin y la desregulación de este proceso está íntimamente relacionado con la enfermedad de Parkinson. Esto se debe, como se explicó anteriormente, a que la mutación en los genes PARK2 y PARK6, que codifican para las proteínas Parkin y PINK1 respectivamente, están asociados a casos juveniles de la enfermedad de Parkinson (Kitada, Asakawa et al. 1998, Valente, Abou-Sleiman et al. 2004).

### 2.3.3. Autofagia en enfermedades neurodegenerativas

La autofagia es un proceso activo en la gran mayoría de células y tejidos del organismo y se ha demostrado que se encuentra desregulado en numerosas enfermedades humanas, como enfermedades neurodegenerativas, cáncer o enfermedades inflamatorias. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, la desregulación de la autofagia es una de las principales causas de la agregación de diferentes proteínas ( $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína, tau o huntingtina) que desencadenan la muerte neuronal. En condiciones normales, estas proteínas son degradadas mediante autofagia pero este proceso puede verse alterado por la mutación de las distintas proteínas que forman los agregados. Estas

## Introducción

formas mutadas son capaces de inhibir la autofagia y esto desencadena la acumulación de agregados (Lee, Yu et al. 2010, Ashkenazi, Bento et al. 2017, Reddy, Yin et al. 2018).

Además, existen enfermedades que son causadas por la mutación de genes que codifican para proteínas implicadas en los procesos de autofagia. Dentro de estas enfermedades se engloban enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (debido a mutaciones en los genes que codifican para Parkin y PINK1) (Kitada, Asakawa et al. 1998), otras enfermedades neurológicas como el Síndrome Vici (causado por mutaciones en el gen que codifica para la proteína EPG5 [Ectopic P-Granules Autophagy Protein 5 Homolog] que está implicada en la fusión de los autofagosomas y los lisosomas) (Cullup, Kho et al. 2013) o enfermedades lisosomales como la enfermedad de Gaucher (causada por mutaciones en el gen que codifica para la enzima lisosomal GBA) (Ebrahimi-Fakhari, Saffari et al. 2016, Aflaki, Westbroek et al. 2017).

El cerebro es el órgano que más glucosa (fuente primaria de energía en vertebrados) consume de todo el organismo y, por ello, en situaciones de ayuno se activan procesos de autofagia en otros órganos, principalmente el hígado, y en las células de glía (Bejarano and Rodriguez-Navarro 2015), con el fin de mantener el aporte de metabolitos al cerebro para mantener la actividad cerebral.

En el cerebro, la activación de la autofagia mediada por la inhibición de mTORC1 (como ocurre en situaciones de ayuno) es fuente de debate ya que existen trabajos en los que apenas se observa (Mizushima, Yamamoto et al. 2004), mientras que en otros sí se ha detectado (Alirezai, Kemball et al. 2010). Aunque estas diferencias en la respuesta del cerebro ante situaciones de ayuno requieren un mayor estudio, sí se ha demostrado que la autofagia se activa en respuesta a diferentes estímulos en el cerebro en desarrollo y en el cerebro adulto (Johnson, Melia et al. 2012) y que son necesarios niveles basales de autofagia para su correcto funcionamiento (Hara, Nakamura et al. 2006, Komatsu, Waguri et al. 2006).

Dentro de los distintos tipos celulares que conforman el cerebro se han observado procesos autofágicos tanto en neuronas (Rodriguez-Muela and Boya 2012) como en células gliales (Janen, Chaachouay et al. 2010).

La autofagia a nivel cerebral está íntimamente relacionada con el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. Se ha observado que la actividad autofágica disminuye con el envejecimiento (Gelino and Hansen 2012) y que existen desregulaciones en estos procesos en distintas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson o de Huntington, así como en enfermedades lisosomales, como la enfermedad de Gaucher, o la esclerosis lateral amiotrófica (Nixon, Wegiel et al. 2005, Karabiyik, Lee et al. 2017, Croce and Yamamoto 2019). Las desregulaciones de la autofagia se producen en la formación de los autofagosomas, la fusión entre autofagosomas y lisosomas o la degradación de material intracelular en el interior de estos orgánulos (Nixon 2013).

Las proteínas que forman agregados en estas enfermedades ( $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína, huntingtina) son degradadas por autofagia en condiciones basales. Si se producen desregulaciones en los procesos de degradación de estas proteínas, se forman agregados que son los causantes de la muerte neuronal característica de estas

## Introducción

enfermedades. Además, se ha observado que formas mutadas de estas proteínas son capaces de inhibir la autofagia promoviendo la formación de agregados. En el caso de la enfermedad de Parkinson, se ha observado que niveles excesivos de  $\alpha$ -sinucleína inhiben los procesos autofágicos alterando la localización subcelular de mATG9 (Winslow, Chen et al. 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la sobreactivación de la autofagia es capaz de degradar agregados de  $\alpha$ -sinucleína (Sarkar, Davies et al. 2007, Filimonenko, Isakson et al. 2010). Todos estos hallazgos han hecho que se esté investigando el uso de tratamientos capaces de modular la autofagia con el fin de paliar los efectos deletéreos causados por la agregación proteica en las enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, se están desarrollando estudios clínicos utilizando rapamicina (#NCT03359538; clinicaltrials.gov), trehalosa o resveratrol (Berman, Motechin et al. 2017).

### 2.3.4. Autofagia en hígado

El descubrimiento del lisosoma y de la autofagia se llevó a cabo utilizando muestras de hígados de roedores (Appelmans and De Duve 1955, Moe and Behnke 1962). El hígado y células hepáticas en cultivo son un muy buen modelo para el estudio de la autofagia ya que es un órgano que presenta elevadas tasas de activación de la autofagia en respuesta a distintos estímulos, preferentemente el ayuno.

La función principal de la autofagia en el hígado es la adaptación a la ausencia de nutrientes y suministrar catabolitos a distintos tejidos para la obtención de energía (Singh and Cuervo 2012). La autofagia en hígado actúa preferentemente sobre distintos tipos de moléculas en función del grado de falta de nutrientes. En las primeras etapas de una situación de ayuno, la autofagia en hígado actúa en primer lugar induciendo la glucogenolisis (ruptura de las reservas hepáticas de glucógeno). La glucosa liberada es utilizada para la obtención de energía mediante la glicolisis.

Si el ayuno persiste, la autofagia hepática actúa induciendo procesos de lipofagia mediante la cual se degradan las gotas lipídicas (agregaciones de lípidos neutros, TAG y ésteres de colesterol [CHOL EST], rodeados por una membrana lipídica) (Singh, Kaushik et al. 2009). Mediante los procesos de lipofagia se liberan al citosol ácidos grasos (FA, por sus siglas en inglés) libres que son catabolizados mediante  $\beta$ -oxidación para la producción de energía y de cuerpos cetónicos. La lipofagia ha sido descrita en numerosos tipos celulares entre los que se encuentran las neuronas y las células de glía (Kaushik, Bandyopadhyay et al. 2011), aunque es en el hígado y en situaciones de ayuno donde este proceso se activa de una manera más acusada (Martinez-Lopez and Singh 2015).

Por último, si continúa la ausencia de nutrientes, la autofagia hepática actúa sobre las proteínas con el fin de poder obtener los aminoácidos y que éstos puedan ser usados para la obtención de energía y la síntesis de proteínas tanto en el hígado como en otros tejidos. La autofagia hepática es menos activa con el envejecimiento (Cavallini, Donati et al. 2001, Donati, Cavallini et al. 2001) lo que podría estar relacionado con la aparición de diferentes enfermedades hepáticas.

Además de la función de la autofagia en condiciones de ayuno, la activación de este proceso en condiciones basales en el hígado contribuye a la homeostasis celular y

## Introducción

tisular en este órgano. Como ocurre en otros órganos, la desregulación de la autofagia a nivel hepático también contribuye a la aparición de diferentes enfermedades. Se han caracterizado alteraciones en la actividad autofágica hepática en hepatitis viral, esteatosis hepática alcohólica (Aishima, Fujita et al. 2010) o enfermedad del hígado graso no alcohólico (Fukuo, Yamashina et al. 2014). La desregulación de la autofagia hepática en estas enfermedades va acompañado por la aparición de inclusiones intracitoplásmicas positivas para la proteína p62, conocidas como cuerpos de Mallory (Zatloukal, French et al. 2007).

Por último, indicar que la autofagia a nivel hepático puede ser modulada mediante modificación genética (Komatsu, Waguri et al. 2005) o la suplementación con distintos lípidos en células en cultivo (Koga, Kaushik et al. 2010). En este trabajo, los autores determinaron los efectos sobre la autofagia mediante el aislamiento de autofagosomas y lisosomas utilizando el mismo protocolo usado en esta tesis doctoral.

## 2.4. Lípidos y autofagia

Dado que los procesos de autofagia requieren la formación de nuevos orgánulos de doble membrana (autofagosomas) y la fusión de la membrana de estos orgánulos con los lisosomas, el papel que juegan los lípidos en los procesos autofágicos es clave.

Desde hace décadas se conocen algunas de las funciones de los lípidos controlando procesos implicados en la progresión de la autofagia. Tradicionalmente, los estudios se han basado en la regulación de la autofagia por parte de distintos tipos de fosfoinosítidos (Jang and Lee 2016) y en la lipidación de la proteína LC3 mediante su unión a PE (Tanida, Ueno et al. 2004).

Además de la implicación de fosfoinosítidos y PE en la autofagia, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios que han puesto de manifiesto nuevas formas de regulación de la autofagia mediada por lípidos. En este punto, es importante destacar que ninguno de los genes *Atg* codifica para enzimas modificadoras de lípidos, salvo quizá *Atg15* que codifica para una enzima con actividad “lipasa” (Epple, Suriapranata et al. 2001).

El intenso trabajo llevado a cabo ha permitido caracterizar cuatro tipos distintos de regulación de la autofagia mediada por lípidos:

- Transducción de señales: Algunas especies lipídicas pueden actuar como segundos mensajeros que median la activación/inhibición de la autofagia regulando la actividad del complejo mTORC1. Esta regulación de la autofagia puede ser llevado a cabo por numerosos tipos de lípidos como: fosfoinosítidos (Hong, Pedersen et al. 2017), fosfolípidos (Toschi, Lee et al. 2009), CL (Hsu and Shi 2017), esfingolípidos (Zhu, Shen et al. 2013) o FA (Liu, Zhou et al. 2016). En otros trabajos se ha caracterizado la regulación directa sobre la autofagia mediada por la suplementación de diferentes clases lipídicas a modelos animales o células en cultivo (O'Rourke, Kuballa et al. 2013, Johansson, Monsen et al. 2015, Niso-

## Introducción

Santano, Malik et al. 2015). En estos trabajos siempre se ha modulado la autofagia de una forma “farmacológica”, activando o inhibiendo distintas rutas celulares que actúan sobre la misma, pero nunca se ha demostrado un efecto “estructural” mediado por la incorporación de estos lípidos exógenos a distintas membranas celulares y regulando/inhibiendo procesos clave para la autofagia como la biosíntesis de autofagosomas (figura 16).

- **Reclutamiento de distintas proteínas efectoras:** La presencia de determinadas especies lipídicas, como PI3P y PI(3,5)P2 (Fosfatidilinositol 3,5 bisfosfato), permite el reclutamiento de proteínas que presentan dominios específicos para la unión a estos lípidos (dominios FYVE [Fab 1(yeast orthologue of PIKfyve), YOTB, Vac1 (vesicle transport protein) EAA1], PX [Phox homology], PH [Pleckstrin homology]) (Lystad and Simonsen 2016). Estas uniones lípido-proteína permiten la progresión de las distintas fases de la ruta autofágica. Se ha demostrado que las uniones PI3P-proteína median las primeras etapas mientras que las uniones PI(3,5)P2-proteína están implicadas en las fases más tardías (Ho, Alghamdi et al. 2012) (figura 16).
- **Modificación de proteínas:** Dentro de este tipo de regulación, el ejemplo clásico es la modificación por lipidación de la proteína LC3 mediante su unión a PE (figura 16). Esta unión lípido-proteína se produce en la membrana de los autofagosomas y permite la progresión de la autofagia. Además de la unión de LC3 a PE, en los últimos años se han publicado trabajos que describen la unión de esta proteína a otros tipos de lípidos como ceramidas (Cer) (Sentelle, Senkal et al. 2012), CL (Chu, Ji et al. 2013) o PS (Sou, Tanida et al. 2006). Estos últimos trabajos han demostrado que la lipidación de LC3 no se da exclusivamente mediante su unión a PE y, por lo tanto, abren la puerta a que en el futuro se descubran nuevas clases lipídicas capaces de unirse a LC3 modulando la autofagia.
- **Efectos sobre membranas lipídicas:** Este último tipo de regulación va íntimamente ligado a la composición lipídica de las membranas de los autofagosomas. Se ha descrito que alteraciones en la composición lipídica de las membranas celulares inducen cambios de curvatura que provocan fusión/fisión de membranas (McMahon and Boucrot 2015). Estos procesos son de vital importancia para el correcto funcionamiento de la autofagia, ya que ésta se inicia con la biogénesis de los autofagosomas, proceso que generalmente implica la escisión de membrana de otro orgánulo subcelular y finaliza con la unión entre el autofagosoma y el lisosoma, lo que implica la fusión de las membranas de estos dos orgánulos subcelulares (figura 16).

En relación al último punto de la regulación de la autofagia mediada por lípidos, es de vital importancia conocer la composición lipídica de las membranas de los

## Introducción

autofagosomas. El esclarecimiento de las clases lipídicas que conforman la membrana de los autofagosomas, así como la abundancia relativa de cada una de ellos, permitiría responder a algunas preguntas clave en relación a la autofagia.

En primer lugar, podría determinarse el origen de los lípidos que forman las membranas de los autofagosomas y qué orgánulos ceden membranas para la formación de estos orgánulos. Al respecto, se han publicado diversos trabajos que han puesto de manifiesto que distintos orgánulos subcelulares actúan como “donantes” de membrana para la formación de autofagosomas ante diferentes situaciones de estrés. Se ha descrito que el retículo endoplásmico (Hayashi-Nishino, Fujita et al. 2009, Yla-Anttila, Vihinen et al. 2009), el aparato de Golgi (Ge, Melville et al. 2013), la membrana plasmática (Ravikumar, Moreau et al. 2010) o los contactos entre el retículo endoplásmico y la mitocondria (MAMs) (Hamasaki, Furuta et al. 2013) ceden lípidos de membrana para la formación de los autofagosomas.

El hecho de caracterizar el origen de los lípidos de membrana cobra aún más importancia si tenemos en cuenta los resultados publicados en un trabajo de 2014 (Mancias, Wang et al. 2014). En este trabajo se analizó la composición proteómica de las membranas de los autofagosomas detectándose enzimas modificadoras de lípidos; indicando que se produce modificación/remodelación de lípidos en las membranas de los autofagosomas que, junto a la transferencia de clases lipídicas específicas desde otros orgánulos subcelulares, contribuyen a la composición de estas membranas. Además, el análisis de las membranas de los autofagosomas ha permitido detectar la presencia de ciertos lípidos como moléculas características de estas membranas (Satori, Ramenazi et al. 2017).

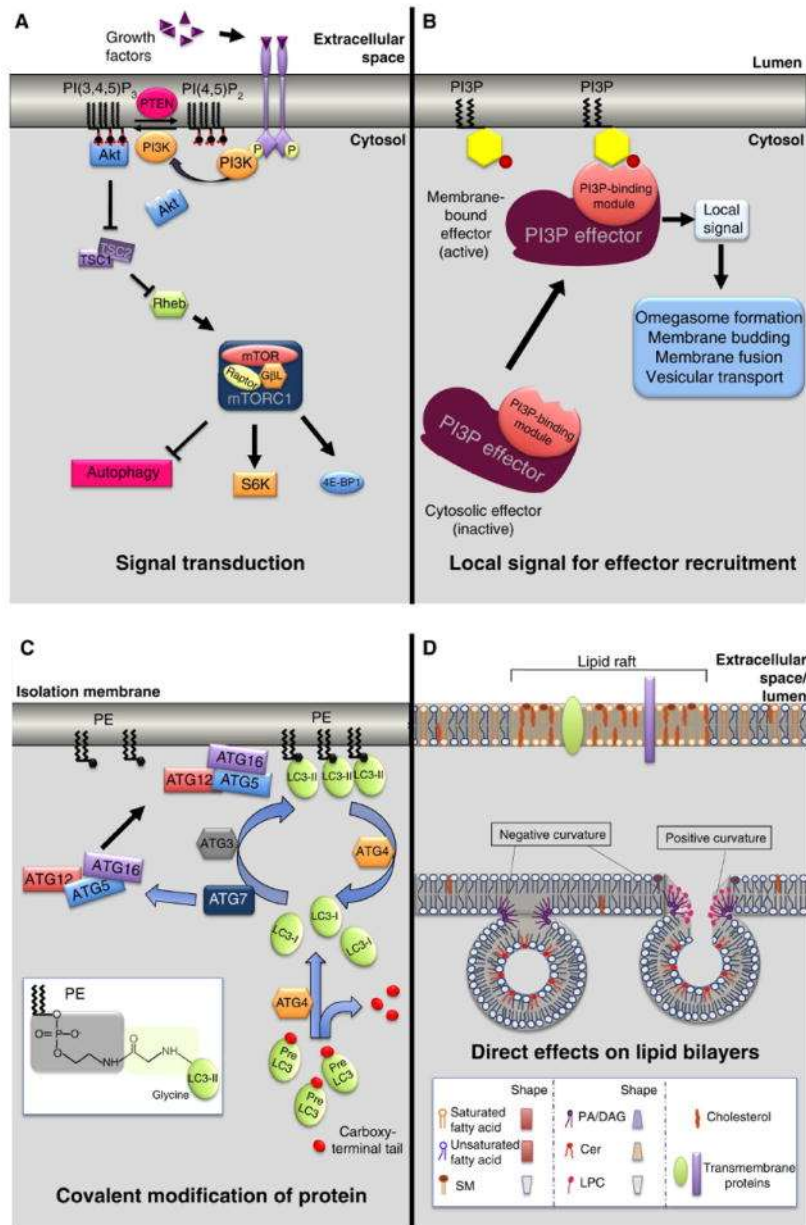
En relación a la caracterización lipídica de membranas celulares, se conoce desde hace tiempo la composición de las membranas de otros orgánulos como el retículo endoplásmico (Waskell, Koblin et al. 1982), la mitocondria (Kiebish, Han et al. 2009), el peroxisoma (Kyrklund and Meijer 1994) o el aparato de Golgi (Zambrano, Fleischer et al. 1975). Además, se ha caracterizado la composición lipídica de la membrana de los lisosomas, uno de los orgánulos implicados en la autofagia, detectándose alteraciones en la misma que afectan a la autofagia mediada por chaperonas (Kaushik, Massey et al. 2006, Rodriguez-Navarro, Kaushik et al. 2012) y a la fusión entre autofagosomas y lisosomas (Koga, Kaushik et al. 2010). Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún trabajo en el que se haya caracterizado la composición lipídica de las membranas de los autofagosomas.

Por otro lado, la caracterización de la composición lipídica de las membranas de los autofagosomas permitiría detectar alteraciones en la misma en situaciones en las que se producen desregulaciones de la autofagia, como el envejecimiento o las enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado en diversos trabajos que estas situaciones van asociados a desregulaciones de la autofagia (Hansen, Rubinsztein et al. 2018, Metaxakis, Ploumi et al. 2018, Nakamura and Yoshimori 2018) y que en afectados de estas enfermedades existen diferencias en cuanto a los niveles de clases y especies específicas de lípidos (Maeba, Maeda et al. 2007, Igarashi, Ma et al. 2011, Kawanishi, Kato et al. 2018). Sin embargo, no se ha descrito la posible relación existente entre estos cambios en los niveles de lípidos y la desregulación de la autofagia en cerebro. Asimismo, tampoco



## Introducción

se ha determinado si estas alteraciones asociadas al envejecimiento o a las enfermedades neurodegenerativas afectan a la biogénesis/composición de las membranas de los autofagosomas.



**Figura 16: Tipos de modulación de la autofagia mediada por lípidos.** **A)** Transducción de señales extracelulares que afectan a la actividad del complejo mTORC1. **B)** Reclutamiento de proteínas efectoras por fosfoinosítidos. **C)** Modificación covalente de proteínas. Lipidación de la proteína LC3 mediante unión a PE. **D)** Efectos sobre la curvatura de membranas. 4E-BP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1. AKT: Protein Kinase B. Cer: Ceramida. DAG: Diacilglicerol. LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3. LPC: Lisofosfatidilcolina. mTOR: mammalian Target Of Rapamycin. PA: Ácido Fosfatídico. PE: Fosfatidiletanolamina. PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinasa. PI(4,5)P<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato. PI(3,4,5)P<sub>3</sub>: Fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato. PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa. Rheb: Ras homolog enriched in brain. S6K: S6 kinase. SM: Esfingomielina. TSC: Tuberous sclerosis protein. Tomado de (Dall'Armi, Devereaux et al. 2013).

### 2.5. Éter lípidos

Los éter-glicerofosfolípidos se caracterizan por presentar un ácido alcohol en vez de un ácido graso unido a la molécula de glicerol en la posición sn-1. Esta unión se lleva a cabo mediante un enlace éter entre el ácido alcohol y el glicerol. Tanto los éter-glicerofosfolípidos, como los diacil-glicerofosfolípidos, presentan en la posición sn-2 un ácido graso unido mediante enlace éster a la molécula de glicerol (Brites, Waterham et al. 2004).

Dentro de los éter-glicerofosfolípidos se diferencian dos grupos en función del tipo de enlace éter que une el ácido alcohol y la molécula de glicerol: los plasmanyl-glicerofosfolípidos y los plasmenyl-glicerofosfolípidos (plasmalógenos). Los primeros se caracterizan por presentar un enlace alquil éter uniendo el ácido alcohol y la molécula de glicerol, mientras, los segundos presentan un enlace vinil-éter en esta posición. Los plasmalógenos son el grupo mayoritario dentro de los éter-glicerofosfolípidos (Braverman and Moser 2012).

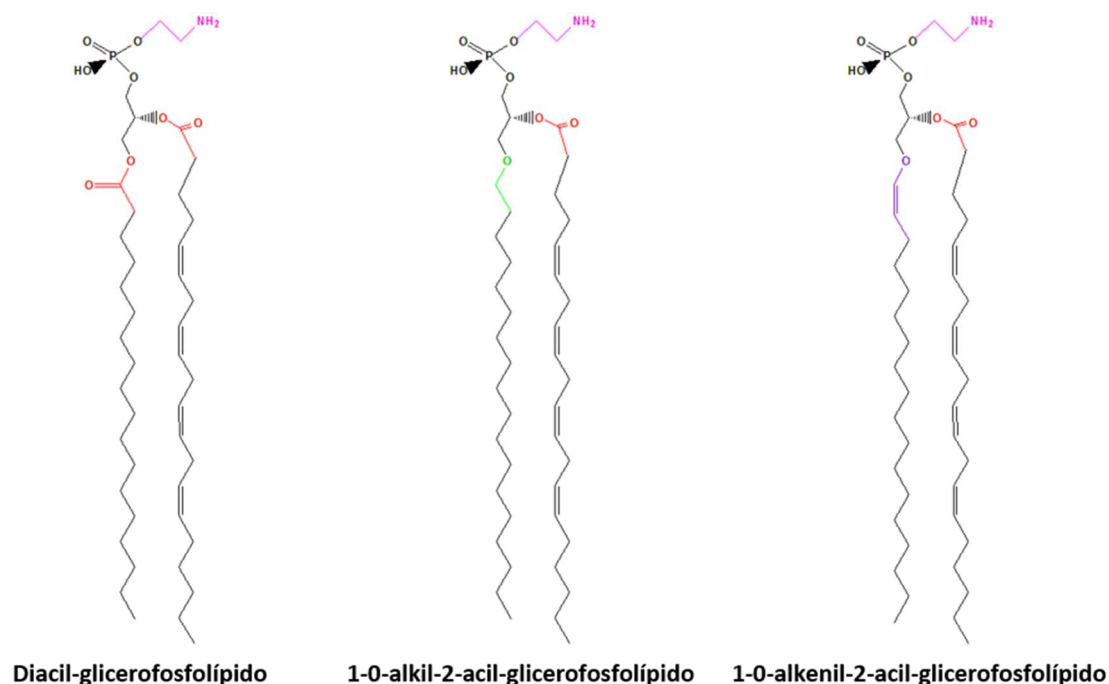
Los éter-glicerofosfolípidos, al igual que los diacil-glicerofosfolípidos, presentan un grupo polar (etanolamina, colina, serina o inositol) unido a la molécula de glicerol. En el caso de los éter-glicerofosfolípidos, los grupos polares mayoritarios son la etanolamina y la colina.

En cuanto a las cadenas laterales, los éter-glicerofosfolípidos presentan mayoritariamente ácidos alcoholes saturados de 16 (16:0) ó 18 (18:0) carbonos o ácidos alcoholes monoinsaturados de 18 (18:1) carbonos en la posición sn-1. En cuanto al ácido graso que esterifica la molécula de glicerol en posición sn-2, suelen ser ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs, por sus siglas en inglés), siendo los mayoritarios el AA (20:4) y DHA (22:6).

En la figura 17 se muestra la estructura de un diacil-glicerofosfolípido, un plasmanyl-glicerofosfolípido y un plasmenyl-glicerofosfolípido (plasmalógeno). Se han resaltado con distintos colores los enlaces que unen los ácidos grasos a la molécula de glicerol:

- **enlace éster** (color rojo) uniendo los ácidos grasos a la molécula de glicerol en las posiciones sn-1 y sn-2 en el diacil-glicerofosfolípido y en la posición sn-2 en los éter lípidos.
- **enlace alkyl** (color verde) uniendo el ácido esteárico en posición sn-1 en el plasmanyl-glicerofosfolípido.
- **enlace alkenyl** (color morado) uniendo el ácido esteárico en la posición sn-1 en el plasmalógeno.

## Introducción



**Figura 17: Estructura de un diacyl-, un alkyl-, y un alkenyl-glicerofosfolípido (plasmalógeno).** En los tres casos los ácidos grasos son el ácido esteárico en posición sn-1 y el ácido araquidónico en posición sn-2.

### 2.5.1. Ruta de biosíntesis

Los éter-glicerofosfolípidos presentan una ruta de biosíntesis diferente a la de los diacyl-glicerofosfolípidos. Se inicia en el peroxisoma y termina en el retículo endoplásmico y tiene como reacciones críticas la unión de un ácido alcohol mediante enlace éter al DHAP (dihidroxiacetona fosfato), catalizado por las enzimas GNPAT (Glyceronephosphate O-Acyltransferase) (EC 2.3.1.42) y AGPS (Alkylglycerone Phosphate Synthase) (EC 2.5.1.26) (figura 18) y la desaturación del enlace éter del plasmanyl-glicerofosfolípido, catalizado por la enzima  $\Delta^1$ -desaturasa (EC 1.14.99.19), que da como producto un plasmalógeno con un enlace vinil éter en la posición sn-1 (figura 18).

Es importante destacar que no existe una enzima capaz de desaturar plasmanil-glicerofosfolípidos que presentan colina como grupo polar y, por lo tanto, la desaturación solo se lleva a cabo en los que presentan etanolamina. Por consiguiente, los plasmalógenos producidos por acción de esta enzima son siempre aquellos que tienen etanolamina como grupo polar. Para la síntesis de plasmalógenos con colina como grupo polar, es necesaria la sustitución de la etanolamina por colina (figura 18).

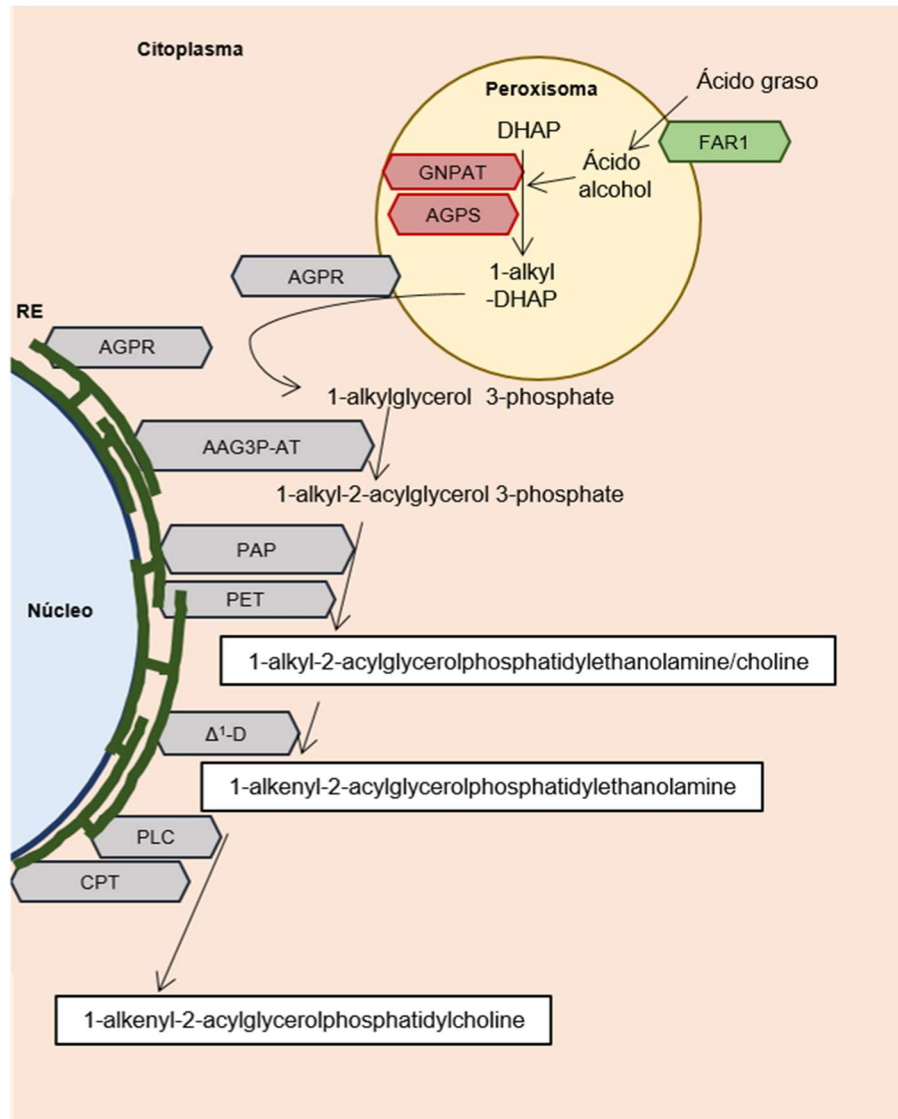
### 2.5.2. Localización subcelular

Una vez formados, los éter lípidos pueden permanecer en la membrana del retículo endoplásmico o pueden ser movilizados a la membrana de otros orgánulos subcelulares

## Introducción

como la membrana plasmática, endosomas (Honsho, Yagita et al. 2008), vesículas sinápticas (Takamori, Holt et al. 2006) y mitocondrias (Kuerschner, Richter et al. 2012).

Es importante destacar que aunque la síntesis de éter lípidos comienza en el peroxisoma, no se ha descrito la presencia de esta clase de lípidos en la membrana de este orgánulo subcelular (Yang, Han et al. 2003) y que hasta la fecha no se ha descrito su presencia en las membranas de los autofagosomas ni de los lisosomas.



**Figura 18: Localización subcelular de las enzimas implicadas en la biosíntesis de éter lípidos y de algunos de los intermediarios formados.**  $\Delta^1$ -D: Delta 1 desaturase. AAG3P-AT: Alkyl/acyl-glycero-3-phosphate acyltransferase. AGPR: Alkylglycerone Phosphate Reductase. AGPS: Alkylglycerone Phosphate Synthase. CPT: Choline Phosphotransferase. DHAP: Dihydroxyacetone phosphate. FAR1: Fatty Acid Reductase 1. GNPAT: Glyceronephosphate O-Acyltransferase. PAP: Phosphatidate phosphatase. PET: Ethanolamine phosphotransferase. PLC: Phospholipase C. RE: Reticulo endoplásmico.

### 2.5.3. Distribución en tejidos

Los éter lípidos constituyen en torno a un 15-20% de los fosfolípidos totales presentes en las membranas celulares. Los niveles de éter lípidos varían de unos tejidos a otros y además se ven afectados por la edad (Braverman and Moser 2012). Los niveles más altos se observan en cerebro y corazón (Panganamala, Horrocks et al. 1971). En algunas regiones cerebrales pueden llegar a constituir un 90% de los fosfolípidos con etanolamina como grupo polar (Han, Holtzman et al. 2001). Además, los niveles de plasmalógenos en la mielina alcanzan el 70% de los glicerolípidos con etanolamina como grupo polar (Farooqui and Horrocks 2001).

En cuanto a los cambios en los niveles de éter lípidos con la edad, se ha descrito que son relativamente bajos en el momento del nacimiento y que durante el primer año de vida se triplican en el cerebro (Balakrishnan, Goodwin et al. 1961). A partir del año, y hasta la edad adulta, los niveles de plasmalógenos se mantienen sin cambios. Por último, se ha descrito que el envejecimiento conlleva una disminución de esta clase lipídica en cerebro (Farooqui and Horrocks 2001) y en suero sanguíneo (Maeba, Maeda et al. 2007).

### 2.5.4. Funciones

Se han descrito numerosas funciones de los éter lípidos; algunas de ellas están compartidas con el resto de diacilglicerol, pero otras son exclusivas de este tipo de lípidos y se deben a la presencia del enlace vinil éter.

#### 2.5.4.1. Papel estructural

Los fosfolípidos son los componentes lipídicos mayoritarios de las membranas celulares y en ellas se pueden encontrar tanto diacil-glicerofosfolípidos como éter-glicerofosfolípidos. Se conoce desde hace tiempo que los diacil-glicerofosfolípidos se encuentran asimétricamente distribuidos entre las dos bicapas lipídicas de las membranas celulares. Esta distribución asimétrica también ha sido descrita en el caso de los éter-lípidos en distintas membranas celulares como el sarcolema de miocitos en cultivo (Post, Verkleij et al. 1988) o la mielina (Kirschner and Ganser 1982).

Otro papel estructural atribuido a los fosfolípidos deriva del hecho de que esta clase de lípidos está enriquecida en los lipid rafts. Éstos constituyen un ejemplo de asimetría de las membranas celulares a nivel de monocapa y se caracterizan por presentar una estructura más “ordenada” y “empaquetada” que las regiones circundantes. El mayor grado de empaquetamiento de los lipid rafts se debe a una mayor proporción de cadenas laterales saturadas de los esfingolípidos y fosfolípidos que la forman. Además, los lipid rafts presentan un mayor grado de CHOL y de proteínas integrales transmembrana (Rajendran and Simons 2005). La mayor cantidad de proteínas integrales de membrana presentes en los lipid rafts explican las funciones celulares que llevan a cabo. Entre estas funciones se encuentran el tráfico de membranas, la transducción de señales extracelulares o la polarización celular (Lingwood, Kaiser et al. 2009).

## **Introducción**

En el caso de los éter lípidos, se ha descrito que están enriquecidos en los lipid rafts (Pike, Han et al. 2002, Rodemer, Thai et al. 2003). En estos trabajos se han descrito mayores porcentajes de plasmalógenos en las membranas plasmáticas de líneas celulares de carcinoma epitelial humano y en la vaina de mielina respectivamente.

### **2.5.4.2. Papel en los procesos de fusión/fisión de membranas**

La presencia del enlace éter en los éter-lípidos determina una estructura tridimensional distinta a los diacil-glicerofosfolípidos (Brites, Waterham et al. 2004). Este enlace provoca un cambio en la distribución espacial de las cadenas laterales que hace que adquieran una estructura inversa hexagonal a menores temperaturas que los diacil-glicerofosfolípidos. Esto provoca que la presencia de éter lípidos en una membrana favorezca que pueda participar en procesos de fusión/fisión de membranas (Paltauf 1994).

El incremento en los procesos de fusión/fisión de membranas ha sido descrito en diversos modelos incluyendo la producción de vesículas in vitro a partir de mezclas conocidas de lípidos. Está descrito que las vesículas formadas con una mezcla de plasmalógenos con etanolamina como grupo polar y fosfatidilcolina (PC) se fusionan a vesículas formadas exclusivamente por PS con una eficiencia seis veces mayor que las vesículas formadas por una mezcla de PE y PC (Glaser and Gross 1994).

Esta función de los éter lípidos puede explicar la abundancia relativa de los mismos en algunas membranas biológicas que experimentan gran cantidad de procesos de fusión/fisión de membranas, como la membrana plasmática o las vesículas sinápticas. Asimismo, la posible presencia de esta clase de lípidos en las membranas de los autofagosomas es un aspecto a tener en cuenta, debido a que estas membranas necesitan estos procesos para su formación a partir de otros orgánulos subcelulares y para su fusión con la membrana de los lisosomas.

### **2.5.4.3. Papel antioxidante**

La exposición a radicales libres y a ROS promueven la oxidación de proteínas y de lípidos causando graves daños en las células. Debido a la presencia del enlace éter, se ha demostrado que los éter lípidos son más susceptibles a procesos de oxidación que los diacil-glicerofosfolípidos (Brites, Waterham et al. 2004). El papel antioxidante de los éter lípidos deriva del hecho de que su oxidación no se propaga a otros lípidos y, por lo tanto, actúa como un punto final a la oxidación lipídica (Sindelar, Guan et al. 1999).

El papel antioxidante de los éter lípidos se ha demostrado en distintos modelos y frente a diferentes inductores de oxidación lipídica. Reiss, et al llevaron a cabo experimentos in vitro de oxidación lipídica en diacil-glicerofosfolípidos en ausencia o presencia de éter lípidos. Los autores describieron que la presencia de plasmalógenos con etanolamina como grupo polar retrasa la oxidación de diacil-glicerofosfolípidos (Reiss, Beyer et al. 1997).

La función antioxidante de los éter lípidos también se ha demostrado en estudios in vitro usando células en cultivo (Zoeller, Lake et al. 1999, Zoeller, Grazia et al. 2002).

## Introducción

En estos trabajos, la estimulación de la síntesis de éter lípidos mediada por la incubación con el precursor Hexadecilglicerol (HG) aumenta la viabilidad celular ante la exposición a inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial o en situaciones de hipoxia.

### 2.5.4.4. Reservorio de segundos mensajeros

Esta función de los éter lípidos deriva del hecho de que este tipo de lípidos presenta un mayor porcentaje de PUFA's, AA (20:4) (Ford and Gross 1989) y DHA (22:6) en posición sn-2 que los diacil-glicerofosfolípidos (Gaposchkin and Zoeller 1999). Los ácidos grasos poliinsaturados representan un 25-30% del total de ácidos grasos en el cerebro y están implicados en el desarrollo y el funcionamiento cerebral (Brites, Waterham et al. 2004). Los plasmalógenos están implicados en la transducción de señales extracelulares ya que éstas pueden inducir la liberación de AA y DHA por acción de la enzima plasmalogenasa A2 (Farooqui, Yang et al. 1995). El AA y el DHA son precursores de la síntesis de eicosanoides que actúan como segundos mensajeros.

### 2.5.5. Éter lípidos y enfermedades

Los éter lípidos se relacionan con distintas enfermedades, bien porque la deficiencia de alguna de las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis cause algunos síndromes patológicos, o bien porque otro tipo de enfermedades alteren los niveles de este tipo de lípidos.

Dentro del primer grupo, existen dos enfermedades hereditarias que cursan con deficiencias en la síntesis de éter lípidos, el síndrome Zellweger y la RCDP (Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata). En la primera, la ausencia de la síntesis de éter lípidos contribuye a la patología causada por deficiencias en la biogénesis de los peroxisomas, mientras que en la segunda es la causa de la enfermedad.

En la RCDP se producen mutaciones en los genes que codifican para las enzimas PEX7 (Peroxisomal Biogenesis Factor 7) encargada del transporte de material al peroxisoma, GNPAT y AGPS (enzimas que catalizan las dos primeras reacciones en la ruta de biosíntesis de éter lípidos). Esta enfermedad presenta entre otros síntomas, graves problemas óseos y severo retraso mental y del crecimiento (White, Modaff et al. 2003).

Dentro del segundo grupo de enfermedades, se encuentran aquellas que aunque no están directamente relacionadas con deficiencias en la síntesis de éter lípidos, sí que presentan alteraciones en sus niveles. Dentro de este grupo se encuentran enfermedades respiratorias como la displasia broncopulmonar o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades inflamatorias y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson (Braverman and Moser 2012).

La enfermedad neurodegenerativa en la que más se han estudiado los niveles de éter lípidos es la enfermedad de Alzheimer. Existen diversos estudios en los que se han analizado los niveles de esta clase lipídica en cerebros de enfermos de Alzheimer y se ha descrito que en éstos son más bajos que en controles sanos. Ginsberg, L., et al describieron

## Introducción

que en cerebros humanos post mortem los niveles de plasmalógenos con etanolamina como grupo polar son más bajos en enfermos de Parkinson que en controles sanos. Además, observaron que esta disminución se producía en las regiones cerebrales afectadas por la enfermedad, mientras que no se presentaba en las regiones cerebrales no afectadas (Ginsberg, Rafique et al. 1995).

En otro estudio, Han, X., et al analizaron el contenido en plasmalógenos en muestras de cerebros de enfermos de Alzheimer y de controles sanos, así como de muestras de cerebro de modelos de ratón. En línea con los resultados publicados en el trabajo citado anteriormente, estos investigadores describieron que en estos enfermos existe una disminución de hasta un 40% de plasmalógenos en el cerebro y que existe una correlación entre el porcentaje de cambio y el grado de severidad de la enfermedad. Por otro lado, utilizando un modelo de ratón para la enfermedad de Alzheimer, observaron que la disminución de los niveles de plasmalógenos es de un 10% a los 18 meses de edad respecto a los controles sanos (Han, Holtzman et al. 2001).

La disminución de éter lípidos también está asociada a otras enfermedades neurodegenerativas como la encefalomiелitis experimental autoinmune o la enfermedad de Parkinson. En un artículo del año 2011 Fabelo N, et al., describieron alteraciones en la composición de lipid rafts obtenidos a partir de muestras post-mortem de corteza cerebral de enfermos de Parkinson y controles sanos. Los autores determinaron que en las muestras provenientes de enfermos de Parkinson los niveles de plasmalógenos son un 15% menores que en los controles sanos (Fabelo, Martin et al. 2011).

Por otro lado, recientemente se han relacionado los éter lípidos y la enfermedad de Parkinson mediante el empleo de la molécula PPI-1011. Esta molécula es un precursor de la biosíntesis de plasmalógenos que puede ser administrada en forma oral a modelos animales (ratones, conejos o monos) de la enfermedad, con el fin de estudiar los efectos del aumento en la producción de esta clase de lípidos (Wood, Smith et al. 2011). La administración de PPI-1011 a monos tratados con MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) y L-DOPA (L-Dopamina) disminuye la aparición de disquinesias (Bourque, Gregoire et al. 2018). Este estudio tiene una gran relevancia porque el tratamiento con L-DOPA es el más utilizado en pacientes de la enfermedad de Parkinson y en un alto número de casos promueve disquinesias como efectos secundarios

Para finalizar, es importante resaltar que aunque se han relacionado las alteraciones en los niveles de éter lípidos con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, aún quedan importantes interrogantes por contestar. Uno de ellos consiste en determinar si la alteración en esta clase lipídica constituye una de las causas de estas enfermedades y, por lo tanto, contribuye a las alteraciones que provocan la muerte neuronal o si por el contrario, es simplemente una consecuencia derivada de otros desórdenes celulares que se dan en este tipo de enfermedades. Por otro lado, todos los estudios que relacionan los éter lípidos y las enfermedades neurodegenerativas se basan en mediciones de los niveles relativos de esta clase de lípidos en muestras, o bien de enfermos o bien de modelos animales, pero muy pocos ahondan en las alteraciones celulares y bioquímicas que subyacen a esta alteración lipídica.





## **III - Objetivos**



## Objetivos

### III - Objetivos

1. Caracterizar la composición lipídica de autofagosomas de hígado y los cambios inducidos por la activación de autofagia, el envejecimiento y la supresión de Parkin.
2. Caracterizar la composición lipídica de mitocondrias de hígado y cerebro y los cambios provocados por el envejecimiento y la ausencia de Parkin.
3. Estudiar los efectos de la eliminación de Parkin y de la estimulación de la síntesis de éter lípidos sobre la actividad autofágica y la funcionalidad mitocondrial.
4. Estudiar la captación, el metabolismo y la localización subcelular de éter lípidos exógenos, y los cambios debidos a la activación de autofagia o mitofagia y por la ausencia de Parkin.

### III - Objectives

1. Characterize liver autophagosome's lipidomic composition and changes induced by autophagy activation, aging and Parkin loss.
2. Characterize liver and brain's mitochondria lipidomic composition and changes due to aging and Parkin loss.
3. Study the effects of Parkin loss and ether lipid's synthesis stimulation over autophagy and mitochondrial functionality after autophagy or mitophagy induction.
4. Study intake, metabolism and subcellular localization of exogenous ether lipids and changes induced by autophagy or mitophagy activation and Parkin loss.



## **IV – Materiales y métodos**



## **IV – Materiales y métodos**

### **4.1. Listas de materiales**

<b>PCR</b>		
<b>Producto</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
Phire Tissue Direct PCR Master Mix	Fisher Scientific	F170S
Agarosa	Promega	V3125
GelStar	Lonza	50535
Marcador peso molecular	Sigma	11 336 45 001

<b>Aislamiento fracciones subcelulares</b>		
<b>Producto</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
Sacarosa	Merck	107687
Inhibidores de proteasas	Calbiochem	539131
Tubo de 50 ml	Nalgene	3117-0500
Tubo de policarbonato	Beckman Coulter	355630
Nycodenz	Palex	428390
Tubo de polialómero	Beckman Coulter	331372

<b>Western-Blot</b>		
<b>Producto</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
Poliacrilamida	Biorad	1610158
Tris	Sigma	T1503
SDS (Dodecilsulfato sódico)	SERVA	20760
PSA (Persulfato amónico)	Sigma	09913
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)	Biorad	161-0801
Glicina	Sigma	67126
Membranas de nitrocelulosa	Amersham	10600048
Ponceau S (Rojo Ponceau)	Sigma	P3504
PBS (Buffer fosfato salino)	Gibco	18912-014
Tween 20	Sigma	P1379
ECL (Enhance Chemiluminiscence)	Biorad	1705061



## Materiales y métodos

Lipidómica		
Producto	Casa comercial	Referencia
NaCl (Cloruro sódico)	Merck	106404
NaF (Fluoruro sódico)	Merck	6449
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (Pirofosfato sódico)	Sigma	221368
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma	E-5134
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Ortovanadato sódico)	Sigma	S6508
Cloroformo	Merck	102442
Metanol	Fisher	M/4056/17
Acetonitrilo	Fisher	A/0638/17
Formato amónico	Sigma	70221
Isopropanol	Merck	1010401000

Cultivos celulares		
Producto	Casa comercial	Referencia
Medio L-15 (Leibovitz L-15)	Biowest	L0300-500
Medio HANK'S (HANK'S Balanced Salt Solution)	Capricorn Scientific	HBSS-3A
Tripsina	Sigma	T4174
Medio DMEM (DMEM High Glucose)	Gibco	11960-044
Suero Fetal Bovino (FBS)	Biowest	S181B-500
L-glutamina	Fisher	W3497 P
Piruvato	Fisher	W3413 D
Antibiótico/Antimicótico	Gibco	15240-062

Inmunofluorescencia/Morfología mitocondrial		
Producto	Casa comercial	Referencia
HG (Hexadecilglicerol)	Santa Cruz	Sc-202394
CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone)	Sigma	C2759
CQ (Cloroquina)	Sigma	C6628
Cubreobjetos circulares de 13 mm	Superior Marienfield	0111520
Poli-D-lisina	Sigma	P6407
Laminina	Sigma	L-2020
Paraformaldehído	Sigma	P6148
Etanol	VWR	20821.365
Ácido acético	Panreac	122703.1611
Triton X-100	Sigma	T9284
Prolong Gold Antifade	Life Technologies	P36930
Hoechst 33342	Life Technologies	H1399
MitoTracker Red CMXRos	Invitrogen	M7512

## **Materiales y métodos**

Seahorse XF		
Producto	Casa comercial	Referencia
Placas Seahorse	Agilent Technologies	102984-000 C
Mito Stress Kit	Agilent Technologies	103010-100
Calibrante (XF Calibrant)	Agilent Technologies	103059-000
Medio de ensayo (Seahorse XF Base Medium)	Agilent Technologies	102353-100
Medio de ensayo (Seahorse XF RPMI)	Agilent Technoogies	103576-100
Glucosa	Sigma	G8769

Fluorescencia de lípidos		
Producto	Casa comercial	Referencia
dL-BSA	Sigma	A8806
Acetato amónico	Merck	1011161000
Isopropanol	VWR	20880.320
3-azido-7-hydroxycoumarin	Jena Bioscience	CLK-FA047-1
Acetonitrilo	VWR	83639.320
Cu(I)-tetrafluoroborato	Sigma	677892
Ácido acético	VWR	20104.298
Hexano	Honeywell	15613
Ácido etil-acético	Julius Hoesch	H1000068133000
Di-isopropiletanolamina	Sigma	D125806
N <sub>3</sub> -sulfo-Cy3	Jena Bioscience	CLK-AZ-119-1
HEPES	Panreac	A1069,1000
Placas TLC (TLC Silica Plates)	Merck	1057210001



### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. Ratones

Para este trabajo se utilizaron ratones de la cepa B57/CL6 de genotipo WT (Wild Type) y PK KO. Para los aislamientos de fracciones subcelulares se utilizaron ratones adultos de dos grupos de edad, jóvenes (2-4 meses) y viejos (20-24 meses), y para los cultivos primarios de glía se utilizaron embriones de 14 días. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la legislación española (RD 53/2013) y a la directiva europea (2010/63/EU), y fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid (ES-280790002001).

#### 4.2.2. Genotipado de ratones

La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se llevó a cabo para el genotipado de los animales empleados en los distintos experimentos. Para ello, se cortó un trozo de cola de los ratones coincidiendo con el destete y el marcaje con microchip de los mismos. Para todo el proceso que se describe a continuación se utilizó el kit comercial Phire Tissue Direct PCR Master Mix.

La extracción del DNA comenzó con la incubación de trozos de cola de 5-10 mm con 20  $\mu$ L de buffer de dilución y 0,5  $\mu$ L de DNA Release en un eppendorf estéril, durante 5 minutos a temperatura ambiente y durante 2 min a 98°C. A continuación, se añadieron 20  $\mu$ L más de buffer de dilución, se agitó en vórtex y se separaron 20  $\mu$ L de la parte superior en otro eppendorf. Después, se midió la cantidad de DNA extraído en un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop) y se llevó a cabo una dilución en buffer de dilución para lograr una concentración aproximada de 50 ng/ $\mu$ L de DNA.

Para llevar a cabo la PCR se utilizaron, por cola, 10  $\mu$ L de Master Mix, 0,5  $\mu$ L de cada uno de los dos Primers [50 ng/ $\mu$ L], 6  $\mu$ L de agua y 3  $\mu$ L de DNA [ $\approx$ 50 ng/ $\mu$ L]. Para la PCR de WT se utilizaron los primers PK1F + PKR y para la de PK KO se utilizaron PK2F + PKR. En cada PCR realizada se puso un control positivo del genotipo buscado, un control negativo y un blanco. En la tabla 4 se muestran la secuencia de bases de los primers. Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

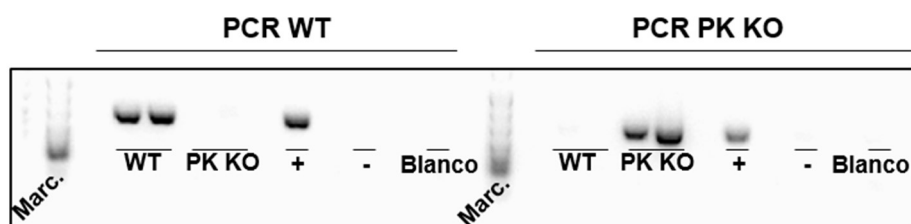
SECUENCIA BASES	
PK1F	TGC TCT GGG GTT CGT C
PK2F	TTG TTT TGC CAA GTT TTA AT
PKR	TCC ACT GGC AGA GTA AAT GT

**Tabla 4:** Secuencia de nucleótidos de los primers utilizados para las PCR de WT y de PK KO.

Una vez acabada la PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1,8% teñido con GelStar (1  $\mu$ L/100 ml de gel) junto con un marcador de peso molecular, a 100

## Materiales y métodos

voltios durante 45 minutos a temperatura ambiente y se reveló en un revelador GelDoc XR (BioRad). En la figura 19 se muestra un gel cargado con DNA extraído de ratones WT y PK KO a los que se les hicieron la PCR de WT o de PK KO.



**Figura 19: Genotipado de ratones WT y PK KO.** Se muestra un gel cargado con DNA extraído de dos ratones WT y dos ratones PK KO a los que se les realizaron una PCR para WT y otra para Parkin. En cada una de las PCR se añadieron un control positivo, un control negativo y un blanco. Marc: Marcador. + : Control positivo. - : Control negativo.

### 4.2.3. Aislamiento de fracciones subcelulares

El protocolo utilizado para el aislamiento de distintas fracciones subcelulares a partir de hígados y cerebros de ratón es una modificación del protocolo descrito en los años 80 del pasado siglo (Marzella, Ahlberg et al. 1982). Mediante este protocolo se pueden aislar las siguientes fracciones subcelulares: homogeneizado, citosol, retículo endoplásmico, autofagosomas, autofagolisosomas, lisosomas y mitocondrias. Este protocolo consta de una serie de centrifugaciones incluyendo una centrifugación en gradiente de densidad de Nycodenz. Es en esta centrifugación en la que se aíslan la mayoría de las fracciones (autofagosomas, autofagolisosomas, lisosomas y mitocondrias).

Se aislaron las fracciones subcelulares a partir de ratones WT y PK KO de dos edades diferentes: jóvenes (de 2 a 4 meses) y viejos (de 20 a 24 meses). Asimismo, se aislaron las fracciones a partir de ratones que dispusieron de comida ad-libitum hasta el momento del sacrificio (ratones WT) o ratones que estuvieron en condiciones de ayuno las 6 horas previas al sacrificio (ratones WT y PK KO).

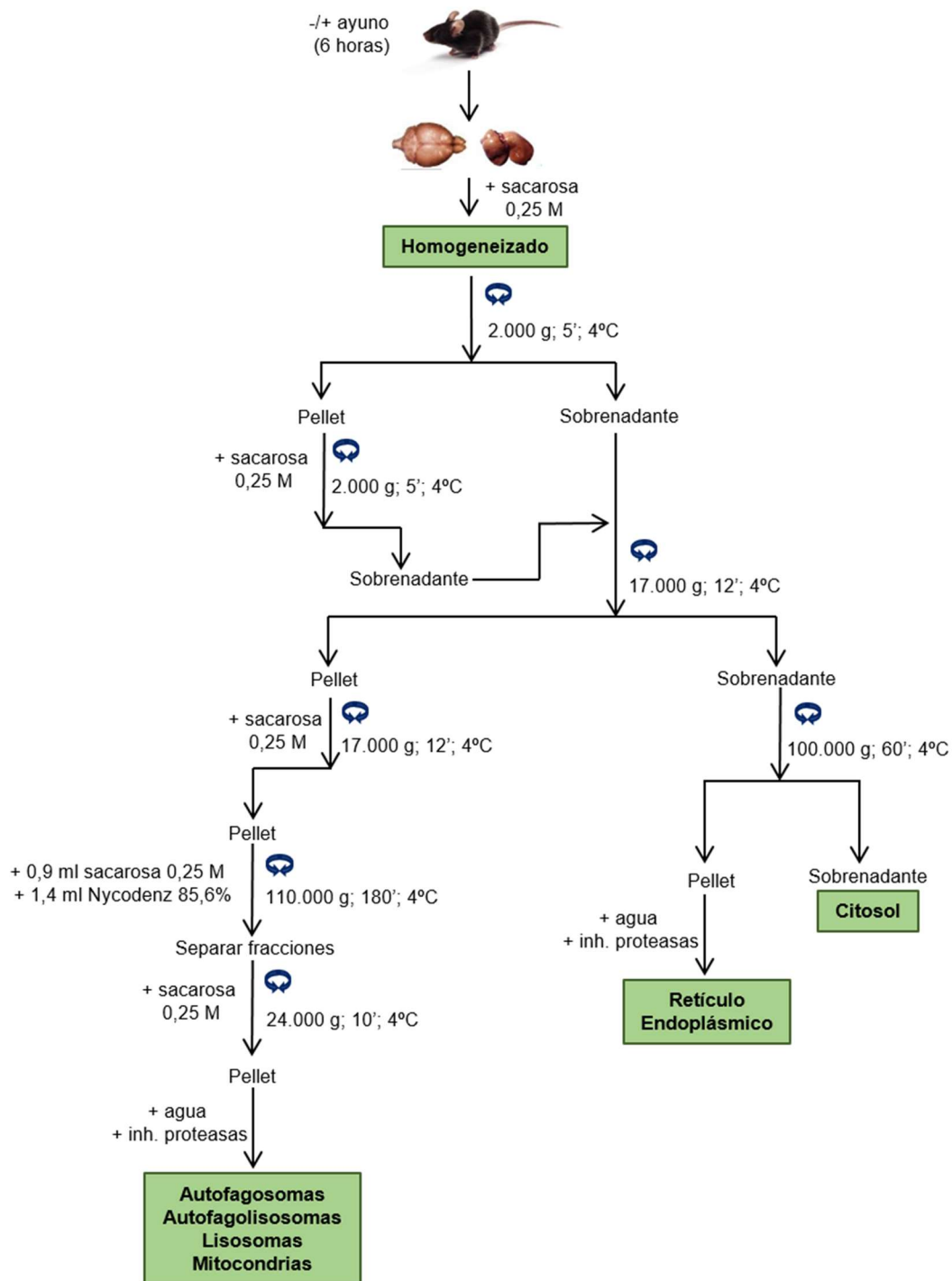
En la figura 20 se muestra un esquema del protocolo utilizado. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron los cerebros y los hígados, los cuales se introdujeron en tubos Falcon de 50 ml con 15 y 20 ml de sacarosa 0,25 M disuelta en agua respectivamente.

Los hígados se disociaron mecánicamente cortándolos con unas tijeras y posteriormente se lavaron tres veces con sacarosa 0,25 M con el objetivo de retirar la mayor cantidad de sangre posible. Los cerebros también se lavaron tres veces con sacarosa 0,25 M pero sin llevar a cabo la disociación mecánica.

El siguiente paso consistió en una homogeneización mecánica con un homogeneizador tipo Potter. Dicha homogeneización se llevó a cabo a 4°C. Tras esta homogeneización se recogió la primera de las fracciones, “homogeneizado”. Se

## Materiales y métodos

recogieron 500  $\mu$ l a los que se les añadieron 5  $\mu$ l de inhibidores de proteasas y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



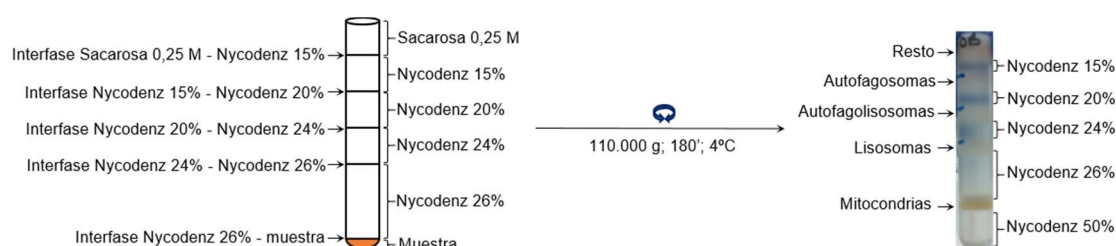
**Figura 20: Protocolo utilizado para el aislamiento de las fracciones subcelulares.**

Tras recoger el homogeneizado se llevó a cabo la primera centrifugación en una centrífuga Beckman J2-HC (Beckman Coulter), con un rotor JA-20 (Beckman Coulter) a 2.000 g durante 5' y a 4°C. Tras la centrifugación se pasó el sobrenadante a otro tubo y el pellet se resuspendió en 20 ml de sacarosa 0,25 M y se centrifugó a 2.000 g durante 5' y a 4°C. Una vez acabada la centrifugación se juntaron los dos sobrenadantes y se

## Materiales y métodos

centrifugaron a 17.000 g durante 12 minutos a 4°C. El sobrenadante de esta nueva centrifugación se pasó a un tubo de policarbonato y se centrifugó a 100.000 g durante 1 hora a 4°C en una ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter) utilizando un rotor 70.1 Ti (Beckman Coulter). El sobrenadante de esta centrifugación era la fracción enriquecida en citosol y el pellet era la fracción enriquecida en retículo endoplásmico. Se recogieron 500 µl de la fracción enriquecida en citosol y la fracción enriquecida en retículo endoplásmico se resuspendió en 500 µl de agua con inhibidores de proteasas. Ambas fracciones se guardaron a -80°C. El pellet de la centrifugación de 17.000 g se resuspendió en sacarosa 0,25 M y se centrifugó a 17.000 g durante 12 minutos y a 4°C.

El sobrenadante de esta centrifugación se descartó y el pellet se resuspendió en 0,9 ml de sacarosa 0,25 M y 1,4 ml de Nycodenz al 85,6% (de esta forma el Nycodenz quedó al 50%). La muestra resuspendida en sacarosa y Nycodenz se depositó en el fondo de un tubo de polialómero y sobre ella se cargaron las diferentes soluciones a distintas concentraciones de Nycodenz: 4 ml de Nycodenz al 26%, 2 ml de Nycodenz al 24%, 2 ml de Nycodenz al 20% y 2 ml de Nycodenz al 15%. En la parte superior del tubo se puso sacarosa 0,25 M hasta completar el volumen del mismo. Los gradientes se centrifugaron en una ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter), a 110.000 g durante 3 horas a 4°C (en condiciones de baja aceleración y ausencia de freno) utilizando un rotor flotante SW 40 Ti (Beckman Coulter). En la figura 21 se muestra la disposición de la muestra y las soluciones a diferentes concentraciones de Nycodenz antes de centrifugar y la disposición de las fracciones separadas al acabar la centrifugación.



**Figura 21: Disposición de la muestra y las distintas concentraciones de Nycodenz antes de la centrifugación y de las fracciones separadas después de la centrifugación.** La fracción “resto” solo se separó en las muestras de cerebro y correspondía mayoritariamente a la mielina.

Una vez terminada la centrifugación, se recogieron las distintas fracciones con una pipeta Pasteur de cristal, se pasaron a tubos de 50 ml, se añadió sacarosa 0,25 M y se centrifugó a 24.000 g durante 10 minutos a 4°C. Después, se descartó el sobrenadante y cada uno de los pellet se resuspendió en 300 µl de agua con inhibidores de proteasas. Por último, se guardaron todas las fracciones aisladas a -80 °C para posteriores análisis (Western-Blot y análisis lipidómicos).

### 4.2.4 Western-Blot

Estos experimentos sirvieron para determinar el enriquecimiento de las distintas fracciones subcelulares aisladas a partir de cerebros e hígados, y para el estudio de cambios en la actividad de la ruta autofágica en astrocitos en cultivo. En todos los casos

## **Materiales y métodos**

las electroforesis se hicieron en geles de poliacrilamida al 10-15% con separadores de 1,5 mm de ancho. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 120 voltios a temperatura ambiente (geles pequeños) o a 4°C (geles grandes). Para la transferencia se utilizaron membranas de nitrocelulosa, y se realizaron a un voltaje constante de 100 voltios durante 1 hora a 4 °C (geles pequeños) o de 15 voltios durante 17 horas a 4 °C (geles grandes).

Una vez terminada la transferencia, se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau (0,1% Ponceau en ácido acético al 5%) con el fin de teñir todas las proteínas transferidas al gel. Posteriormente, se lavaron las membranas con PBS-T (Buffer fosfato salino-Tween 20) para quitar toda la tinción de Ponceau. Tras esto, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión con leche al 5% disuelta en PBS-T. El siguiente paso consistió en la incubación con el anticuerpo primario (disuelto en leche al 5% en PBS-T) durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron: anti-LC3 (MBL; # PM036), anti-Citocromo C (BD Pharmingen; # 556432), anti-VDAC (Cell Signaling; # 4661), anti-LAMP1 (DSHB; # 1D4B), anti-Calnexina (Abcam; # ab192439), anti-PEMT (Santa Cruz; # sc-27260), anti-PSD (Santa Cruz; # sc-86196), anti-p62 (Enzo; # BML-PW9860), anti-Actina (Sigma; # A5441) y anti-TOM20 (Cell Signaling; # 13929).

A continuación, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T a temperatura ambiente y con agitación. La incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (Horseradish Peroxidase) (dilución 1/1500 en leche al 5% en PBS-T) se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP utilizados fueron: anti-Rabbit HRP (Sigma; # A0545), anti-Mouse HRP (Sigma; # A5906), anti-Rat HRP (Sigma; # AP136P) y anti-Goat HRP (Sigma; # SAB3700274).

Posteriormente, se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T y un lavado de 10 minutos con PBS (Buffer fosfato salino) a temperatura ambiente y en agitación. El último paso consistió en revelar las membranas utilizando un equipo Mod FluorChem E (Protein Simple). El densitometrado de las bandas obtenidas se llevó a cabo utilizando el programa informático ImageJ.

### **4.2.5. Lipidómica**

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización lipidómica de distintas fracciones subcelulares de cerebro e hígado de ratón, así como de astrocitos en cultivo. Dentro de las fracciones subcelulares aisladas, se analizó la composición lipídica de los autofagosomas de hígado y de las mitocondrias tanto de hígados como de cerebros.

En todos los casos, la extracción de los lípidos se llevó a cabo mediante un procedimiento basado en el método de Folch (Folch et al., 1957). La única diferencia en cuanto al protocolo de extracción de lípidos radicó en la cantidad de proteína total de partida. Para los autofagosomas se extrajeron los lípidos a partir de 90 µg de proteína. En el caso de las mitocondrias se utilizaron 500 µg de muestra y, por último, para la



## Materiales y métodos

extracción de los lípidos a partir de astrocitos se utilizaron muestras con 60 µg de proteína total.

Como paso previo a la extracción de lípidos, se centrifugaron las muestras, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer de lisis para lipidómica (sin detergentes; TRIS 50 mM; NaCl 125 mM; NaF 5,3 mM; Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2,3 mM; EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; Inhibidores de proteasas). La extracción de lípidos comenzó con la mezcla de la muestra con una solución de cloroformo:metanol 1:4. Se mezclaron 500 µl de muestra con 2 ml de solución cloroformo:metanol. A continuación, se agitaron las muestras en una “noria” durante 17 horas a 4 °C. Tras la agitación, se centrifugaron las muestras a 750 g durante 10 minutos a 4 °C. Una vez acabada la centrifugación, se extrajo la fase inferior a un tubo nuevo y se añadieron 1,5 ml de cloroformo al tubo que contenía la fase superior y se agitó en vórtex. Posteriormente, se centrifugó el tubo que contenía la fase superior a 750 g durante 10 minutos a 4 °C. Se extrajo de nuevo la fase inferior y se juntó con la fase inferior que se había separado anteriormente en otro tubo. En el tubo que contenía las dos fases inferiores se añadió 1 ml de solución metanol:agua 1:1 y se agitó en vórtex. Tras la agitación, se centrifugó a 750 g durante 10 minutos a 4 °C. Una vez acabada la centrifugación, se extrajo la fase inferior y se pasó a un tubo nuevo. Por último, se evaporó el volumen de los tubos utilizando nitrógeno gaseoso manteniendo los tubos en un termobloque a 45 °C.

Los fosfolípidos (PE, PC, lisofosfatidilcolina [LPC] y lisofosfatidiletanolamina [LPE]) y los esfingolípidos (Cer, dihidroCeramida [dhCer], SM y hexosilceramida [HexCer]) se analizaron usando LC-MS/MS (Cromatografía líquida-Espectrometría de masas). Las especies lipídicas se separaron utilizando una columna Kinetex C18 (100 Å; 2,1 mm; 1,7 µm; Phenomenex) a 55 °C. Se aplicó durante 12 minutos un gradiente desde 60% solvente A (60% acetonitrilo en agua, 10 mM formato amónico) a un 100% solvente B (90% isopropanol en acetonitrilo, 10 mM formato amónico), seguido de 8 minutos de re-equilibrado a un flujo constante de 0,4 ml/min. Las clases lipídicas se detectaron en un sistema QTrap 4000 (AB SCIEX) y se analizaron usando el software informático Analyst versión 1.6.2. Los espectros se adquirieron en modo de ionización positivo, y se utilizó N<sub>2</sub> a 500 °C como gas secante. Los extractos lipídicos se disolvieron en 250 µl de acetonitrilo:isopropanol (1:1) y el volumen de inyección fue de 2 µl para los fosfolípidos y 5 µl para los esfingolípidos. Las especies lipídicas se identificaron en base a su tiempo de retención en la cromatografía líquida, y a su patrón de fragmentación en el espectrómetro de masas. El análisis de PI, PS, PG y CL se llevó a cabo mediante LC-MS/MS usando una columna Kinetex HILIC (100 Å; 2,1 mm; 1,7 µm; Phenomenex) a 45 °C. Los extractos lipídicos se disolvieron en 100 µl de cloroformo y se inyectaron 10 µl en el sistema. En la tabla 5 se muestran los distintos estándares internos utilizados en los distintos análisis lipidómicos de este trabajo.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa informático GraphPad. Se realizaron análisis ANOVA de una vía y análisis Holm-Sidak posterior. Para la realización de los “mapas de calor” (heatmaps) se utilizó el software informático MetaboAnalyst 4.0 (Xia, Psychogios et al. 2009).

## **Materiales y métodos**

Lípido	Cantidad (pmoles)/muestra
PC (28:2)	2.000
PE (16:1)	1.000
LPC (17:0)	1.000
LPE (14:0)	600
TAG (19:0;19:0;19:0)	1.000
SM (N12:0)	1.000
Cer (N19:0)	1.000
HexCer (N15:0)	1.000
dhCer (35:0)	400
CE (17:0)	31.000
CL (14:0) <sub>4</sub>	200
PG (17:0)	200
PS (28:0)	1000

**Tabla 5: Estándares lipídicos utilizados en los análisis lipidómicos.**

### **4.2.6. Cultivos primarios de glía embrionaria**

Los cultivos primarios de glía se obtuvieron a partir de cortezas cerebrales de embriones de ratón de 14 días y de genotipo WT o PK KO. El protocolo comenzó con la muerte por dislocación cervical de la hembra preñada y la extracción de los embriones. Una vez extraídos, los embriones se colocaron en placas Petri con medio L-15 (Leibovitz L-15). Tras la obtención de las cortezas cerebrales, se llevó a cabo una disociación mecánica de las mismas con un bisturí. El siguiente paso consistió en pasar los trozos con una punta de P1000 cortada a una placa con HBSS (Hanks's Balanced Salt Solution) e incubarlos durante 10 minutos a 37°C. Tras esta incubación, se pasaron los trozos con ayuda de una punta de P1000 cortada a una placa con 0,6 ml de Tripsina 10X y 5,4 ml de HANK'S y se incubaron durante 10 minutos a 37°C.

A continuación, se pasaron los trozos con ayuda de una punta de P1000 cortada a criotubos con 1 ml de medio completo (DMEM [Dulbecco's Modified Eagle's Medium] suplementado con 15% FBS [Suero Fetal Bovino], 4mM L-glutamina, 1 mM piruvato y antibiótico/antimicótico) y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio completo y se volvió a centrifugar a 1.500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminada la centrifugación, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio completo. La resuspensión del pellet se llevó a cabo dando 10-15 pases con una punta de P1000 cortada y posteriormente 10-15 pases con una punta de P1000 sin cortar.

Tras la resuspensión del pellet, se contó el número de células y se sembraron en torno a 8-10 millones de células por flask en medio completo. A la semana de haber sembrado las células, se cambió todo el medio y a partir de entonces, se cambió el medio cada 2-3 días. Cuando las células alcanzaron la confluencia se levantaron y se sembraron para llevar a cabo distintos experimentos (inmunofluorescencia, western-blot, lipidómica, Seahorse Biosciences).

## Materiales y métodos

#### 4.2.7. Inmunofluorescencia

Estos experimentos se utilizaron para determinar el estado de la autofagia/mitofagia y la localización subcelular de clases específicas de lípidos en cultivos primarios de astrocitos WT o PK KO.

Para los experimentos de inmufluorescencia, se sembraron las células sobre cubreobjetos circulares de 13 mm. Previamente, estos cubres fueron pretratados con poly-D-lisina y laminina. Se añadieron 80  $\mu$ l de poly-D-lisina a cada cubre y se incubó durante 45-120 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se retiró la poly-D-lisina, se lavó tres veces con agua estéril y se dejó secar. Una vez secos los cubres, se añadió una gota de 80  $\mu$ l de laminina y se incubó durante 1 hora a 37°C. Pasada esta hora, se retiró la laminina y se dejó secar.

Se sembraron 30.000 células por cubre en una gota de 80 µl de medio completo y se incubaron durante 10-15 minutos, con el fin de permitir a las células adherirse a los cubreobjetos, antes de completar el volumen hasta 500 µl con medio completo. Las células se incubaron a 37°C durante 2-3 días.

En función de las condiciones del experimento a realizar se llevaron a cabo distintos tratamientos (figura 22).

### Condiciones basales (medio completo las 24 horas)

**Activación de autofagia (medio sin suero las últimas 6 horas)**

**Activación de mitofagia (incubación con CCCP las últimas 6 horas)**



**Figura 22: Distintos protocolos de incubación para los experimentos de inmunofluorescencia.** Condiciones basales, activación de autofagia mediante retirada de suero y daño mitocondrial mediante incubación con CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) (10  $\mu$ M; 6 horas)). Se indica si se incubó con HG (Hexadecilglicerol) (20  $\mu$ M; 24 horas) o si se bloqueó la degradación lisosomal con CQ (Cloroquina) (100  $\mu$ M; 2 horas).

Tras el tratamiento de las células se llevó a cabo la fijación de las mismas utilizando paraformaldehído (PFA) disuelto en PBS. El primer paso consistió en retirar el medio de cultivo, añadir 500 µl de PFA al 2% e incubar durante 10 minutos sobre una placa con hielo. Transcurrido este tiempo, se retiró el PFA al 2% y se incubó con PFA al 4% el mismo tiempo y en las mismas condiciones que en el paso anterior. Una vez pasados estos 10 minutos, se hicieron tres lavados con 500 µl de PBS frío por pocillo. Después de los tres lavados, se llevó a cabo el proceso de permeabilización mediante la adición de 500 µl de etanol:acético (19:1) y la incubación durante 10 minutos a -20°C. Posteriormente, se lavó tres veces con 500 µl de PBS frío y se bloquearon los sitios inespecíficos de unión con solución de bloqueo (450 µl de PBS, 50 µl de FBS y 5 µl de

## **Materiales y métodos**

Triton X-100 al 10% por pocillo). Se incubó con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados para los experimentos de inmunofluorescencia fueron: anti-LC3 (MBL; # PM036), anti-p62 (Enzo; # BML-PW9860), anti-LAMP1 (DSHB; # 1D4B) y anti-TOM20 (Santa Cruz; # sc-11415).

Durante esta hora, se prepararon las diluciones de los anticuerpos primarios. La dilución dependió del anticuerpo a utilizar, pero en todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo. Pasada la hora de incubación con la solución de bloqueo, se pasaron los cubres a una cámara húmeda y se añadieron 60 µl de anticuerpo primario por cubre. Se incubaron los cubres con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario, se hicieron tres lavados con PBS y se añadieron 70 µl de anticuerpo secundario marcado fluorescentemente disuelto en solución de bloqueo (en este caso todos los anticuerpos se diluyeron 1/500) y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Los anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo fueron: anti-rabbit 488 (Life Technologies; # A11034), anti-rabbit 594 (Life Technologies; # A11012), anti-rat 594 (Life Technologies; # A11007), anti-rat 488 (Life Technologies; # A11006) y anti-rat 647 (Life Technologies; # A21247).

El último paso consistió en lavar tres veces cada cubre con PBS frío, lavar con agua y montar los cubreobjetos sobre portaobjetos con ayuda de Prolong gold antifade. Los núcleos se marcaron con Hoechst 33342. Las imágenes se tomaron en un microscopio Nikon Eclipse Ci acoplado a una cámara Nikon DS-Ri1.

### **4.2.8. Análisis de la morfología mitocondrial**

Para llevar a cabo este análisis se marcaron las mitocondrias con la sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos. Se incubaron las células con la sonda (200 nM) durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se llevó a cabo el mismo protocolo que el explicado en el apartado de inmunofluorescencia (la sonda MitoTracker puede combinarse con el uso de anticuerpos marcados fluorescentemente). El análisis de los distintos parámetros relativos a la funcionalidad mitocondrial se llevó a cabo utilizando el “Mito-Morphology Macro” del programa informático Image J desarrollado por Ruben K. Dagda (Dagda, Cherra et al. 2009).

### **4.2.9. Analizador de flujo metabólico (Seahorse XF)**

El analizador extracelular de flujo metabólico XF de la marca Agilent Technologies se utilizó para la determinación del estado de la respiración mitocondrial de astrocitos en cultivo.

El analizador de flujo metabólico XFp permite la determinación del estado de la respiración mitocondrial y de la glicolisis mediante la medición de variaciones en la presión parcial de oxígeno (OCR: Oxygen Consumption Rate) y del pH (ECAR:

## **Materiales y métodos**

ExtraCellular Acidification Rate) respectivamente. Este equipo posee una serie de sensores que miden estos parámetros en volúmenes muy pequeños, y además, permite la adición de distintos compuestos (hasta un máximo de cuatro por experimento) que se inyectan en los pocillos de forma secuencial y en un orden y tiempos determinados por el usuario. En todos los experimentos se establecieron tiempos de mezcla y de medida de 3 minutos cada uno. En este trabajo se representan las gráficas de OCR.

### **4.2.9.1. Placas y kits**

En este trabajo se usaron los analizadores XFp y XFe que utilizan placas de 8 y 96 pocillos respectivamente. En cuanto a su funcionamiento, estos dos equipos miden los mismos parámetros (presión parcial de oxígeno y pH), permiten el cálculo de OCR y ECAR y se pueden inyectar hasta 4 compuestos de forma secuencial.

Existen diversos kit comerciales para estos equipos que permiten la modulación de la respiración mitocondrial y de la glicolisis mediante la adición de determinados compuestos. La ventaja de estos kit comerciales es que está muy bien establecido el efecto de cada compuesto sobre el OCR y el ECAR y además son altamente reproducibles. Aun así, es importante indicar que los tipos de experimentos que se pueden realizar en este equipo son infinitos ya que cualquier compuesto puede ser inyectado en los pocillos. En este trabajo se utilizó el kit comercial Mito Stress Kit.

### **4.2.9.2. Mito Stress Kit**

Este kit permite la determinación de parámetros relativos a la actividad mitocondrial de células en cultivo, mediante la medición de variaciones en la tasa de consumo de oxígeno. Esta determinación se lleva a cabo añadiendo diversos compuestos que afectan a la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En este kit los compuestos que se inyectan a las células son: Oligomicina (1  $\mu\text{M}$ ), FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone) (2  $\mu\text{M}$ ) y Rotenona/Antimicina A (0,5  $\mu\text{M}$  de cada uno).

La oligomicina es un inhibidor del complejo V mitocondrial, la ATP sintasa y su adición induce una disminución en el OCR debido al bloqueo del transporte de protones a través de la membrana interna mitocondrial.

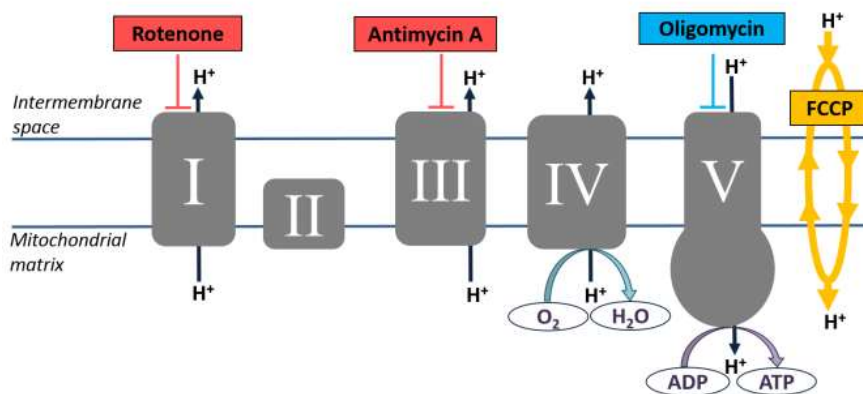
El FCCP es un protonóforo que permite el paso de protones a través de la membrana interna mitocondrial independientemente de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que induce un aumento máximo de OCR.

La combinación de Rotenona/Antimicina A bloquea por completo la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. La rotenona actúa bloqueando el complejo I mitocondrial y la antimicina A bloquea el complejo III mitocondrial. Al añadir estos dos compuestos se inhibe por completo el paso de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana a través de la membrana interna mitocondrial y, de esta forma, se bloquea el consumo de oxígeno por el complejo IV mitocondrial. Es importante indicar que en la práctica, la adición de estos dos compuestos no produce una disminución total

## Materiales y métodos

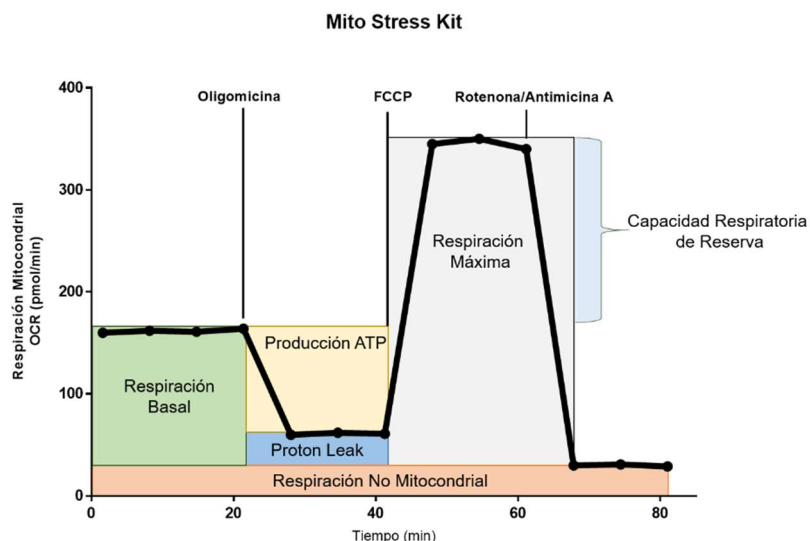
de OCR debido a que en las células existen procesos de “respiración no mitocondrial”, esto es, procesos celulares distintos de la actividad de la cadena respiratoria que consumen oxígeno.

En la figura 23 se muestra un esquema de la cadena de electrones mitocondrial y de los distintos complejos que la forman, así como la acción de los compuestos que se inyectan en el Mito Stress Kit.



**Figura 23: Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y efecto de los compuestos del Mito Stress Kit.** FCCP: Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone. Tomado de la página web de Agilent Technologies.

En la siguiente figura se muestra un ejemplo de un experimento de Mito Stress Kit. Se representa el OCR y sus variaciones con los tres compuestos que se inyectan en este kit, así como una representación de todos los parámetros que pueden ser calculados.



**Figura 24: Cinética de la tasa de consumo de oxígeno y variaciones causadas por la inyección de los compuestos del MitoStress Kit.**

El uso del Mito Stress Kit permite calcular seis parámetros relativos a la actividad mitocondrial de células en cultivo. Los parámetros que se pueden calcular utilizando el Mito Stress Kit son:

## **Materiales y métodos**

- Tasa basal de respiración mitocondrial: Es la tasa de consumo de oxígeno inicial menos la tasa de respiración no mitocondrial.
- Producción de ATP: Es la tasa de consumo de oxígeno inicial menos la tasa de consumo de oxígeno tras la adición de oligomicina.
- Proton Leak: Es la tasa de consumo de oxígeno tras la adición de oligomicina menos la tasa de respiración no mitocondrial.
- Tasa máxima de respiración mitocondrial: Es la tasa de consumo de oxígeno tras la adición de FCCP menos la tasa de respiración no mitocondrial
- Capacidad respiratoria de reserva: Es la tasa de consumo de oxígeno tras la adición de FCCP menos la tasa de consumo de oxígeno inicial.
- Tasa de respiración no mitocondrial: Es la tasa de consumo de oxígeno tras la adición de Rotenona/Antimicina A.

### **4.2.9.3. Realización de experimentos**

Antes de sembrar las células en las placas, los pocillos se pretrataron con poly-D-lisina y laminina. La poly-D-lisina (20  $\mu$ l por well) se incubó durante 45-120 minutos a 37 °C y pasado este tiempo, se lavó tres veces con agua estéril y se dejó secar. Una vez seca la placa, se añadió la laminina (20  $\mu$ l) a todos los pocillos y se dejó incubando a 37 °C durante 1 hora. Pasado este tiempo, se retiró la laminina y se dejó secar. Para todos los experimentos de este trabajo se sembraron 20.000 células por pocillo en una gota de 20  $\mu$ l de medio completo. Se incubó durante 10-15 minutos para permitir que las células se adhirieran al fondo del pocillo y, posteriormente, se añadieron 160  $\mu$ l de medio completo por pocillo. Se dejó incubando la placa a 37°C durante 2-3 días para permitir que las células se dividiesen y formasen una monocapa en el fondo del pocillo.

El día antes del experimento, se hidrató el cartucho con calibrante. Este cartucho tiene los sensores y los puertos donde se cargan los distintos compuestos que se inyectan a las células. El cartucho se incubó durante toda la noche en una estufa sin suministro de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Para los experimentos de Seahorse se llevaron a cabo los mismos tratamientos que para los experimentos de inmunofluorescencia, a excepción de la incubación con cloroquina (CQ). Por lo tanto, se incubaron las células en ausencia o presencia de HG (20  $\mu$ M) durante 24 horas y a las 18 horas de experimento se cambió el medio a DMEM con suero, sin suero o con CCCP (10  $\mu$ M).

El día del experimento se preparó el medio de ensayo (Seahorse XF Base Medium suplementado con 25 mM glucosa, 4 mM L-glutamina y 1 mM piruvato). Este medio se caracteriza por no tener ningún tampón que amortigüe los cambios de pH (este hecho es indispensable para poder ver los cambios de pH y determinar de esta manera el ECAR). El día del experimento se cambió el medio de las células a medio de ensayo y se incubó en una estufa sin suministro de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 1 hora.

## Materiales y métodos

Durante esta hora, se resuspendieron los viales con los compuestos a inyectar en medio de ensayo y se cargaron en los puertos. Una vez preparados los compuestos, y tras cargarlos en los puertos, se inició el experimento metiendo el cartucho con los sensores en el equipo para su calibración. Tras la calibración de los sensores, se introdujo la placa con las células y comenzó la medida de OCR y ECAR.

### 4.2.10. Fluorescencia de lípidos: propargyl lipids y click reaction

Esta parte del trabajo se llevó a cabo en colaboración con los doctores Lars Kuerscher y Cristoph Thiele del LIMES (Life and Medical Sciences) Institut de la Universidad de Bonn (Alemania), durante una estancia de tres meses que realicé en su laboratorio.

Este grupo fue pionero en la utilización de alkenil lípidos para el estudio de la captación, el metabolismo y la localización subcelular de lípidos en células en cultivo (Gaebler, Milan et al. 2013, Kuerschner and Thiele 2014, Gaebler, Penno et al. 2016). Los alkenil lípidos se caracterizan por la presencia de un triple enlace añadido de forma sintética. Los propargil lípidos son un tipo de alkenil lípidos en los que el triple enlace se añade en la cabeza polar en lugar de añadirse en el extremo de un ácido graso, como ocurre en el resto de los alkenil lípidos. La unión del triple enlace en la cabeza polar impide que sea intercambiado entre distintas clases de lípidos. En el caso de los alkenil lípidos que presentan el triple enlace en un ácido graso, se puede observar como este ácido graso puede intercambiarse entre distintas clases de lípidos.

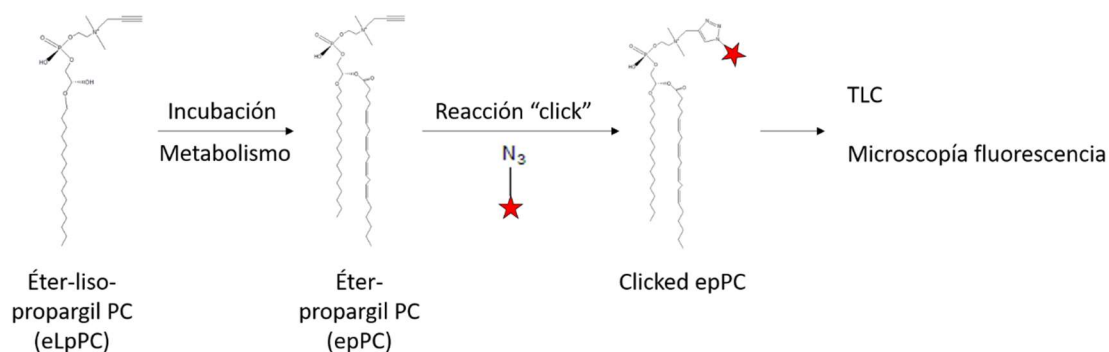
En este trabajo se utilizó un análogo sintético de un éter lípido que se encuentra de forma natural en las células. Se utilizó el éter-liso-propargil fosfatidilcolina (eLpPC) con un ácido palmítico (16:0) unido mediante enlace alquil-éter en la posición sn-1 de la molécula de glicerol. Este lípido es metabolizado por las células dando como producto el éter-propargil-fosfatidilcolina (propargil-plasmanil fosfatidilcolina; epPC) mediante la unión de un ácido graso en la posición sn-2 de la molécula de glicerol.

En la figura 25 se muestra un esquema del protocolo de detección de propargil lípidos. En primer lugar, se llevó a cabo la incubación de las células en cultivo con el lípido durante 24 horas. Pasado este tiempo, se detectó el lípido mediante una reacción química llamada “click reaction”, mediante la cual se unió un reportero azido (este reportero variaba en función del experimento que se llevase a cabo) al triple enlace del propargil lípido. La “click reaction” es compatible con otras técnicas como la cromatografía en capa fina (TLC; en este caso el reportero que se utiliza es azido coumarin) o la microscopía de fluorescencia (en este caso se usa un reportero N<sub>3</sub>-S-Cy3).

En la figura 26 se muestra un esquema del protocolo de incubación utilizado con el propargil lípido. La incubación con eLpPC (20 µM) se llevó a cabo durante 24 horas añadiendo lípido a las células a las 0 horas y a las 18 horas cuando se cambiaba el medio a medio con suero, sin suero o con CCCP. A las 22 horas de incubación se añadió CQ (100 µM). Por último, a las 24 horas, o bien se fijaron las células para experimentos de microscopía o bien se extrajeron los lípidos tanto del medio como de las células para experimentos de TLC.



## Materiales y métodos



**Figura 25: Protocolo utilizado para el trabajo con el propargil lípido.** Se añadió propargil lípido (eLpPC; 20  $\mu$ M) a astrocitos WT y PK KO en cultivo durante 24 horas. TLC: Cromatografía en capa fina.



**Figura 26: Protocolos de incubación para los experimentos con eLpPC.** La incubación con eLpPC se llevó a cabo durante 24 horas con dos adiciones de lípido (una a las 0 horas y otra a las 18 horas). A las 18 horas se cambió el medio a medio con suero, sin suero o con CCCP. En algunas condiciones se añadió cloroquina a las 22 horas de experimento.

### 4.2.10.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

Mediante esta técnica se estudió la captación de eLpPC por astrocitos en cultivo y su metabolismo para producir epPC. Tras la incubación con el lípido y los tratamientos para inducir autofagia/mitofagia y bloquear la degradación lisosomal, se llevó a cabo la extracción de los lípidos tanto del medio de cultivo como de las células.

#### 4.2.10.1.1. Extracción de lípidos de medio de cultivo

En primer lugar, se cogieron 300  $\mu$ l de medio de cada una de las condiciones ensayadas y se pasaron a tubos eppendorf de 1,5 ml. A continuación, se centrifugó a 500 g durante 3 minutos, y se cogieron 200  $\mu$ l de la parte superior (sin tocar el precipitado) y se pasaron a un tubo eppendorf de 2 ml. Después, se añadieron 800  $\mu$ l de una mezcla 1:3 de cloroformo:metanol y se agitó en vórtex hasta que se observó una sola fase. El siguiente paso consistió en centrifugar a 20.000 g durante 5 minutos para que precipitasen los posibles restos celulares que hubiese en el medio y las proteínas del suero. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo eppendorf de 2 ml y se añadieron 300  $\mu$ l de cloroformo y 500  $\mu$ l de agua antes de agitar en vórtex. A continuación, se centrifugó a 20.000 g durante 1 minuto para separar las fases acuosa (fase superior) y orgánica (fase inferior). La fase superior se aspiró casi en su totalidad y se recogió la fase orgánica (fase inferior) con una pipeta automática. La fase orgánica se pasó a un tubo eppendorf de 1,5 ml. El siguiente paso consistió en evaporar todo el cloroformo quedándose los lípidos adheridos a la pared del tubo eppendorf. Esta evaporación se llevó a cabo en un Speed-

## **Materiales y métodos**

Vac (Concentrator Plus, Eppendorf) centrifugando las muestras en vacío y a una temperatura de 45°C. Una vez evaporada toda la fase orgánica, se resuspendió el pellet lipídico en 20 µl de cloroformo.

### **4.2.10.1.2. Extracción de lípidos de células en cultivo**

Una vez retirado el medio de cultivo, se lavaron dos veces las células con PBS + 0,5% dL-BSA (delipidated Bovine Serum Albumin) y dos veces con una solución 155 mM de acetato amónico. A continuación, se añadieron a cada well 400 µl de una mezcla 1:5 de cloroformo:metanol y se pasó esta solución a un tubo eppendorf de 2 ml. Se repitió la adición de 400 µl de la mezcla de cloroformo:metanol y se añadió al mismo tubo eppendorf de antes. Para extraer las células, se añadieron 200 µl de isopropanol a cada well y se juntaron estos 200 µl con los 800 µl de la mezcla de cloroformo:metanol que tienen los lípidos extraídos. En este punto, se confirmó que se tenía una única fase en los tubos. El siguiente paso consistió en centrifugar a 20.000 g durante 5 minutos para sedimentar las proteínas celulares y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 2 ml. A continuación, se añadieron 300 µl de cloroformo y 500 µl de agua a cada tubo y se agitó en vortex. La separación de las fases acuosa y orgánica se logró mediante centrifugación a 20.000 g durante 1 minuto. Al igual que en el caso de los medios de cultivo, se extrajo la fase orgánica (fase inferior) y se pasó a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se evaporó el cloroformo en un Speed-Vac y el pellet lipídico se resuspendió en 20 µl de cloroformo.

Una vez resuspendidos los lípidos extraídos de los medios de cultivo y de las células, las muestras se procesaron en paralelo. Antes de llevar a cabo la reacción “click”, se preparó una mezcla conocida de lípidos para usar como estándar en la placa de TLC (para este trabajo se utilizó como estándar una mezcla de 25 mM eLpPC y 25 mM pPC [propargil Fosfatidilcolina]). El siguiente paso consistió en la reacción “click” mediante la cual se unió el reportero a los propargil lípidos. En el caso de los experimentos de TLC, el reportero era un “azido-coumarin” (3-azido-7-hydroxycoumarin). Se preparó la solución con el reportero (850 µl etanol, 125 µl acetonitrilo, 125 µl 10mM Cu(I)-tetrafluoroborato en acetonitrilo y 10 µl azidocoumarin), se añadieron 40 µl a cada tubo con los lípidos extraídos y se incubaron a 42°C durante toda la noche para que se llevase a cabo la reacción “click”. Las muestras se cargaron en una placa de TLC con el uso de capilares y se introdujo la placa en una cubeta con una solución de cloroformo/metanol/agua/ácido acético 65/25/4/1 durante 40 minutos. Pasado este tiempo, se secó la placa y se metió en una cubeta con una solución hexano/ácido etil-acético 1/1 durante otros 40 minutos. Estas soluciones subieron por capilaridad por la placa movilizandolos lípidos y separándolos. Por último, se hidrató la placa con una solución 4% diisopropiletanolamina en hexano (Base Hünig) durante unos segundos y se dejó evaporar el exceso de base Hünig durante 1 minuto. El último paso consistió en la detección de la señal utilizando una cámara CCD acoplada a un sistema de imagen. El sistema estaba equipado con excitación LED y los correspondientes filtros de emisión de fluorescencia para la detección de la señal. El software informático utilizado para la toma de imágenes fue Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics).

### 4.2.10.2. Microscopía de fluorescencia

Estos experimentos sirvieron para estudiar la localización subcelular del éter propargil lípido añadido y de los productos de su metabolismo, así como posibles cambios de localización provocados por la inducción de autofagia/mitofagia o por el bloqueo de la degradación lisosomal. En estos experimentos los tiempos de incubación con el lípido y de inducción de autofagia/mitofagia y bloqueo de la degradación lisosomal fueron los mismos que para los experimentos de TLC.

Tras la incubación de las células en cultivo con el propargil lípido, el protocolo era el mismo que para una inmunofluorescencia general (fijación de las células, bloqueo de los sitios inespecíficos de unión, incubación con el anticuerpo primario e incubación con el anticuerpo secundario). En el caso de la incubación con propargil lípidos, fue necesario llevar a cabo la reacción “click” para que se produjese la unión del propargil lípido con el reportero azido fluorescente. El reportero azido utilizado fue el N<sub>3</sub>-sulfo-Cy3 que posee un máximo de emisión de fluorescencia a 555 nm. La reacción se inició incubando los cubres con las células con una solución que contenía el reportero azido (0,2 µl de reportero azido por cada ml de solución 100 mM HEPES [(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N’-[2-ethanesulfonic acid]])). Se incubaron los cubres con esta solución durante 1 hora en un baño a 43 °C. La reacción se inició añadiendo Cu(I), que era el catalizador de la misma, disuelto en acetonitrilo (31,4 mg de Cu(I)TFB [Tetrafluoroborato] en 1 ml de acetonitrilo). Se añadieron 20 µl de Cu(I)TFB por cubre. Pasados 30 minutos, se volvió a añadir 20 µl de solución Cu(I)TFB. Pasada la hora de incubación a 43 °C, se lavaron los cubres tres veces con buffer 100 mM HEPES y después varias veces (de 10 a 15 veces) con solución 20 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) disuelto en PBS. Una vez llevados a cabo estos lavados, se incubó con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) y se montaron los cubres en los portaobjetos. La visualización de la fluorescencia y la toma de imágenes se llevaron a cabo en un microscopio Zeiss Observer Z1 equipado con una cámara Hamamatsu Digital Camera C11440 Orca-Flash 4.0 y un apotome Zeiss (ZEISS Apotome. 2).

## **V – Resultados**



## V. Resultados

### 5.1. Enriquecimiento de las fracciones subcelulares aisladas y cambios con el envejecimiento y la eliminación de Parkin

El primer objetivo del trabajo fue la caracterización lipidómica de orgánulos subcelulares, lo que requirió como paso previo el aislamiento y el estudio del grado de enriquecimiento de las fracciones aisladas, ya que solo aquellas con elevadas tasas eran susceptibles de ser utilizadas posteriormente en los análisis lipidómicos. El enriquecimiento se determinó mediante experimentos de Western-Blot comparando los niveles de proteínas marcadoras de los distintos orgánulos entre los homogeneizados y las fracciones subcelulares. Asimismo, se estudió si existían diferencias debidas al envejecimiento o a la supresión de Parkin. Las proteínas utilizadas como marcadores de las distintas fracciones aisladas fueron: LC3 (autofagosomas y autofagolisosomas), Cit C (Citocromo C) y VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) (mitocondrias), LAMP1 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1) (lisosomas) y Calnexina (retículo endoplásmico).

#### 5.1.1. LC3-II en las distintas fracciones

En la figura 27 se muestran imágenes de western-blot de las fracciones subcelulares aisladas a partir de cerebros e hígados de ratones WT y PK KO jóvenes tras ayuno de 6 horas e incubadas con un anticuerpo frente a LC3. Esta proteína presenta dos isoformas en función de si está o no lipidada. Debido a que la forma no lipidada (LC3-I) y lipidada (LC3-II) presentan distinta movilidad electroforética y que la isoforma LC3-II está presente en la membrana de los autofagosomas, el enriquecimiento de este orgánulo en las distintas fracciones pudo determinarse midiendo el incremento del ratio LC3-II/LC3-I comparado con el obtenido en los homogeneizados.

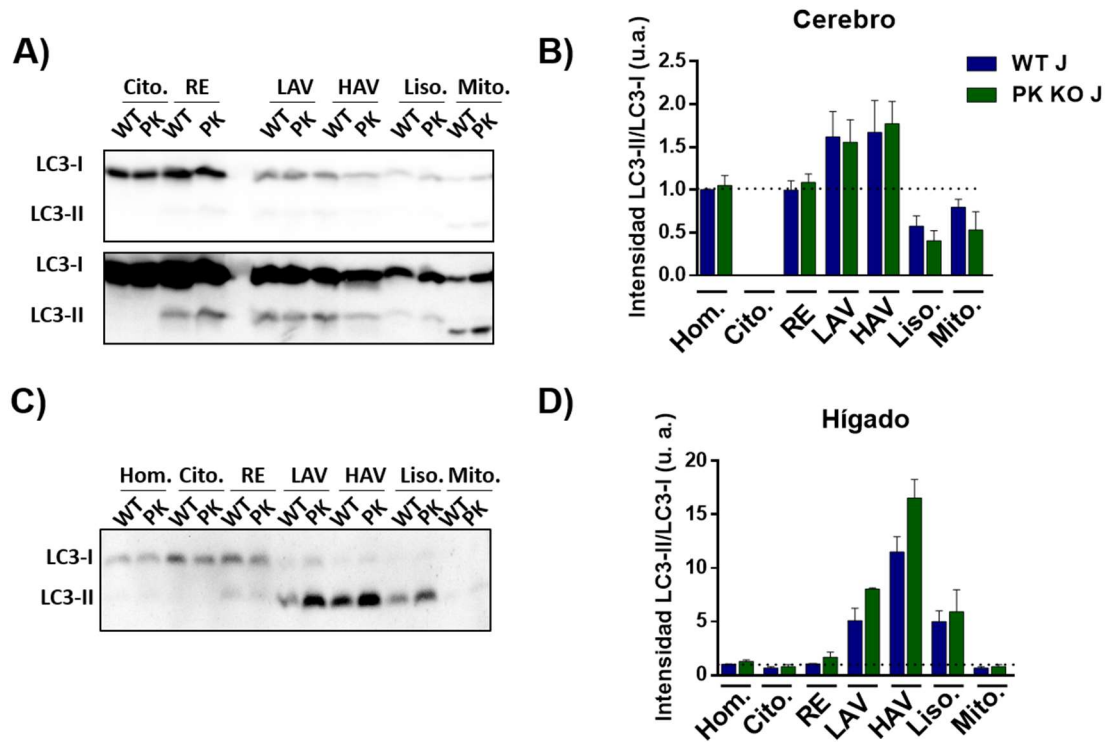
En el citosol se observó solo la banda de LC3-I lo que indicaba que en esta fracción no se estaban recogiendo restos de membrana. En los autofagosomas y autofagolisosomas se aumentó el ratio LC3-II/LC3-I frente a los homogeneizados, pero aun así las tasas de enriquecimiento que se obtuvieron en este tejido fueron muy bajas (en torno a 1,5-2 veces) (figura 27; paneles A y B). Al obtener un enriquecimiento tan bajo de estas fracciones en cerebro no se pudo utilizar esta fracción para análisis lipidómico. Por último, en la fracción enriquecida en mitocondrias no se observó prácticamente banda de LC3-I y la banda de LC3-II aparecía a una altura inferior que en el resto de fracciones (figura 27; panel A).

En el caso de las fracciones obtenidas a partir de hígados se observó que el protocolo de aislamiento de autofagosomas y autofagolisosomas era mucho más efectivo.

En los homogeneizados de hígado solo se observó la banda de LC3-I, al igual que en las fracciones enriquecidas en citosol y en retículo endoplásmico (figura 27; panel C). Por el contrario, en las fracciones enriquecidas en autofagosomas, autofagolisosomas y

## Resultados

lisosomas se observó la banda de LC3-II con una intensidad más alta que en los homogeneizados (figura 27; paneles C y D). En este tejido, el enriquecimiento de la fracción de autofagosomas fue de unas 10-15 veces, lo que permitió asumir que el análisis lipidómico de esta fracción correspondía en un alto grado a las membranas de los autofagosomas. Por último, en la fracción enriquecida en mitocondrias se observó, al igual que ocurría en el cerebro, una baja intensidad de las bandas de LC3-I y LC3-II (figura 27; panel C).



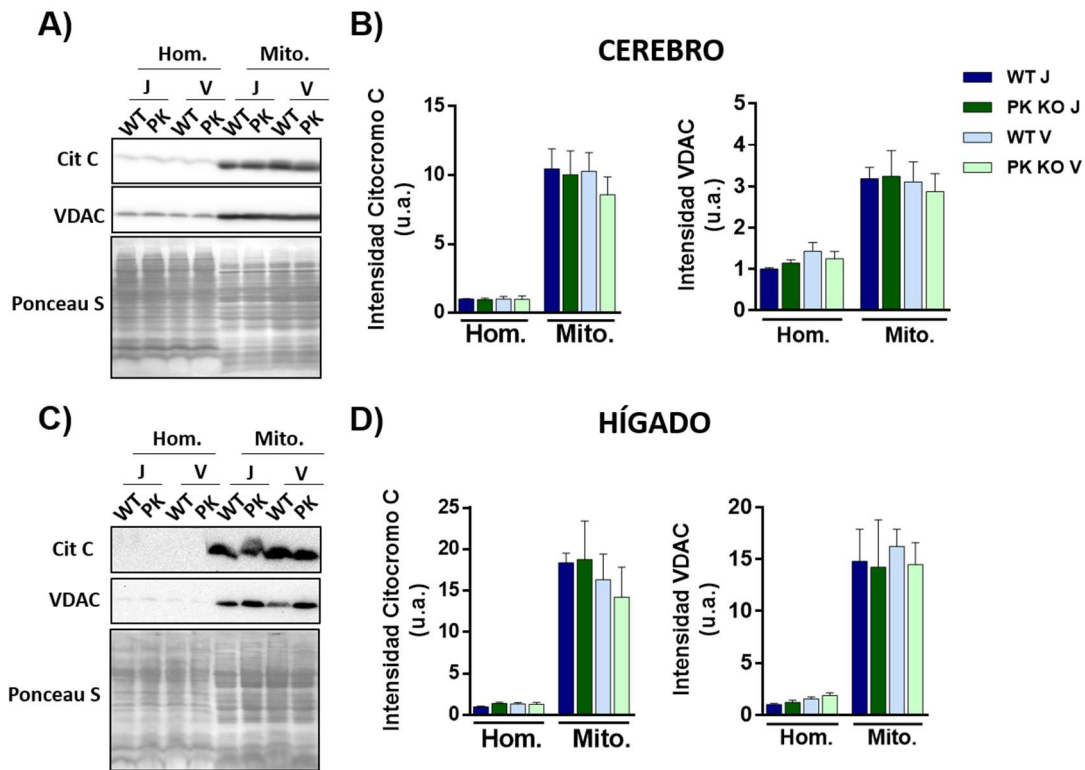
**Figura 27: Enriquecimiento de LC3-II en las fracciones subcelulares aisladas de cerebros e hígados.** **A)** Western-Blot de fracciones subcelulares de cerebro de ratones WT y PK KO jóvenes tras ayuno de 6 horas. Se muestra el mismo western con dos exposiciones distintas para mostrar las bandas correspondientes a LC3-I y LC3-II. **B)** Cuantificación del ratio de la intensidad de señal LC3-II/LC3-I en las fracciones subcelulares de cerebro. Normalizado frente a WT joven. **C)** Western-Blot de fracciones subcelulares de hígado de ratones WT y PK KO jóvenes tras ayuno de 6 horas. **D)** Cuantificación del ratio de la intensidad de señal LC3-II/LC3-I en las fracciones subcelulares de hígado. Normalizado frente a WT joven. Cito: Citosol. HAV: Heavy Autophagosomal Vesicles (autofagolisosomas). HOM: Homogeneizado. J: Joven. LAV: Light Autophagosomes Vesicles (autofagosomas). Liso: Lisosomas. Mito: Mitocondrias. RE: Retículo endoplásmico. u.a.: unidades arbitrarias. n=3 para cada condición.

### 5.1.2. Fracción mitocondrial

Se estudió el enriquecimiento de la fracción mitocondrial observando los niveles de Cit C y VDAC en homogeneizados y mitocondrias. VDAC se localiza en la membrana externa mitocondrial y es un canal aniónico dependiente de voltaje que participa en la entrada de calcio en las mitocondrias en determinadas situaciones. Además, se localiza en los MAMs, que son zonas en las que se produce transferencia de lípidos entre la

## Resultados

mitocondria y el retículo endoplásmico, y transferencia de lípidos para la formación de autofagosomas en algunas situaciones (Vance 2014).



**Figura 28: Enriquecimiento de la fracción mitocondrial en cerebros e hígados.** A) Western-Blot de homogeneizados y mitocondrias de cerebros de ratones WT y PK KO jóvenes y viejos tras ayuno de 6 horas frente a Cit C y VDAC. B) Cuantificación de la intensidad de la señal de Cit C y VDAC en fracciones subcelulares de cerebro. Valores normalizados frente a la señal de Homogeneizados WT Joven. C) Western-Blot de homogeneizados y mitocondrias de hígado de ratones WT y PK KO jóvenes y viejos tras ayuno de 6 horas frente a Cit C y VDAC. D) Cuantificación de la intensidad de la señal de Cit C y VDAC en fracciones subcelulares de hígado. Valores normalizados frente a la señal de Homogeneizados WT Joven. Cit C: Citocromo C. Hom: Homogeneizado. J: Joven. Mito: Mitocondria. V: Viejo. VDAC: Voltage Dependent Anion Channel. u.a.: unidades arbitrarias. n=3 para cada condición.

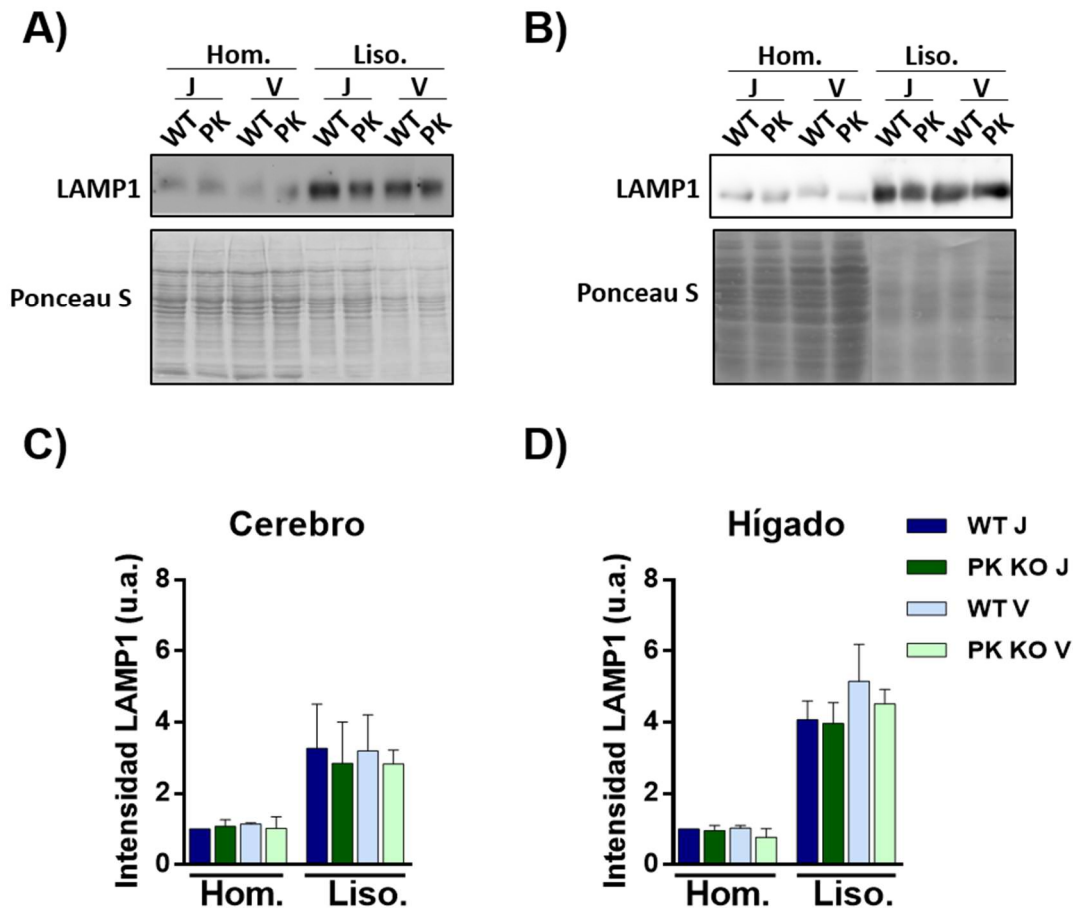
En los dos órganos se observó enriquecimiento de Cit C y VDAC en la fracción mitocondrial respecto a los homogeneizados (figura 28). Al igual que ocurría para los autofagosomas, el protocolo utilizado produjo un mayor enriquecimiento en hígado. En el cerebro los enriquecimientos de Cit C y VDAC en la fracción mitocondrial respecto al homogeneizado estaban en torno a 10 y 3 veces, mientras que en el caso de los hígados estos valores aumentaban hasta 17-18 y 15 veces respectivamente (figura 28; paneles A-D). Aunque el enriquecimiento de la fracción mitocondrial en cerebro no era tan alto como en hígado, se aisló una fracción lo suficientemente pura como para poder llevar a cabo un análisis lipídico de las membranas mitocondriales aisladas. Por último, no se produjeron cambios en los niveles de Cit C o VDAC ni con el envejecimiento ni con la eliminación de Parkin (figura 28; paneles A-D).



## Resultados

### 5.1.3. Fracción lisosomal

Se caracterizó el enriquecimiento de la proteína de membrana lisosomal LAMP1 en los homogeneizados y en la fracción enriquecida en lisosomas. Tanto en cerebro como en hígado la fracción lisosomal se encontraba enriquecida en LAMP1 unas 3-4 veces respecto a los homogeneizados (figura 29; paneles A-D). En este caso, el protocolo de aislamiento de fracciones subcelulares en cerebro permitió aislar una fracción enriquecida en lisosomas. No se produjeron cambios en la cantidad de LAMP1 en la fracción lisosomal ni por el envejecimiento ni por la supresión de Parkin.



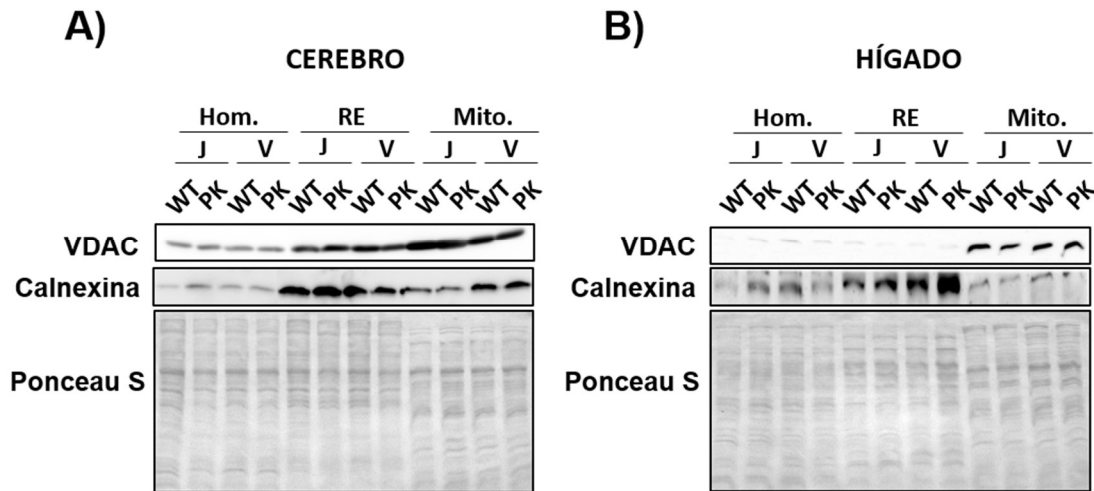
**Figura 29: Enriquecimiento de la fracción lisosomal en cerebros e hígados.** **A)** Marcaje de LAMP1 en western-blot de homogeneizados y lisosomas aislados a partir de cerebros de ratones WT y PK KO jóvenes y viejos tras 6 horas de ayuno. **B)** Marcaje de LAMP1 en western-blot de homogeneizados y lisosomas aislados a partir de hígado de ratones WT y PK KO jóvenes y viejos tras 6 horas de ayuno. **C)** Cuantificación de la señal de LAMP1 en cerebros. Valores normalizados frente a Homogeneizado WT Joven. **D)** Cuantificación de la señal de LAMP1 en hígados. Valores normalizados frente a Homogeneizado WT Joven. Hom: Homogeneizado. J: Joven. Liso: Lisosoma. V: Viejo. u.a.: unidades arbitrarias. n=3 para cada condición.

### 5.1.4. Fracción de retículo endoplásmico

Para determinar el enriquecimiento de esta fracción se utilizó como marcador la proteína calnexina. Se observó enriquecimiento de calnexina en la fracción de retículo

## Resultados

endoplásmico respecto a los homogeneizados, siendo éste mayor para las fracciones aisladas a partir de hígados (figura 30; paneles A y B). Las diferencias en el aislamiento a partir de cerebros o hígados se produjeron en la señal de calnexina que se obtenía en la fracción mitocondrial. En cerebros había más señal de calnexina en la fracción mitocondrial que en los hígados, lo que pudo deberse a una mejor separación de estas dos fracciones en hígados o a la mayor presencia de MAMs en el cerebro. Además, había una mayor señal del marcador mitocondrial VDAC en los retículos endoplásmicos de cerebro (figura 30; paneles A y B).



**Figura 30: Enriquecimiento de la fracción de retículo endoplásmico en cerebros e hígados.** A) Marcaje de VDAC y Calnexina en western-blot de homogeneizados, retículos endoplásmicos y mitocondrias aislados a partir de cerebros de ratones WT y PK KO jóvenes y viejos tras 6 horas de ayuno. B) Marcaje de VDAC y Calnexina en western-blot de homogeneizados, retículos endoplásmicos y mitocondrias aislados a partir de hígados de ratones WT y PK KO jóvenes y viejos tras 6 horas de ayuno. Hom: Homogeneizado. J: Joven. Mito: Mitocondria. RE: Retículo endoplásmico. V: Viejo. u.a.: unidades arbitrarias. n=3 para cada condición.

Todos estos resultados indicaron que el protocolo utilizado permitía el aislamiento de fracciones enriquecidas en orgánulos subcelulares a partir de cerebros e hígados susceptibles de ser utilizadas para los análisis lipidómicos.

## 5.2. Lipidómica de autofagosomas de hígado de ratones WT. Efecto de la inducción de autofagia y del envejecimiento.

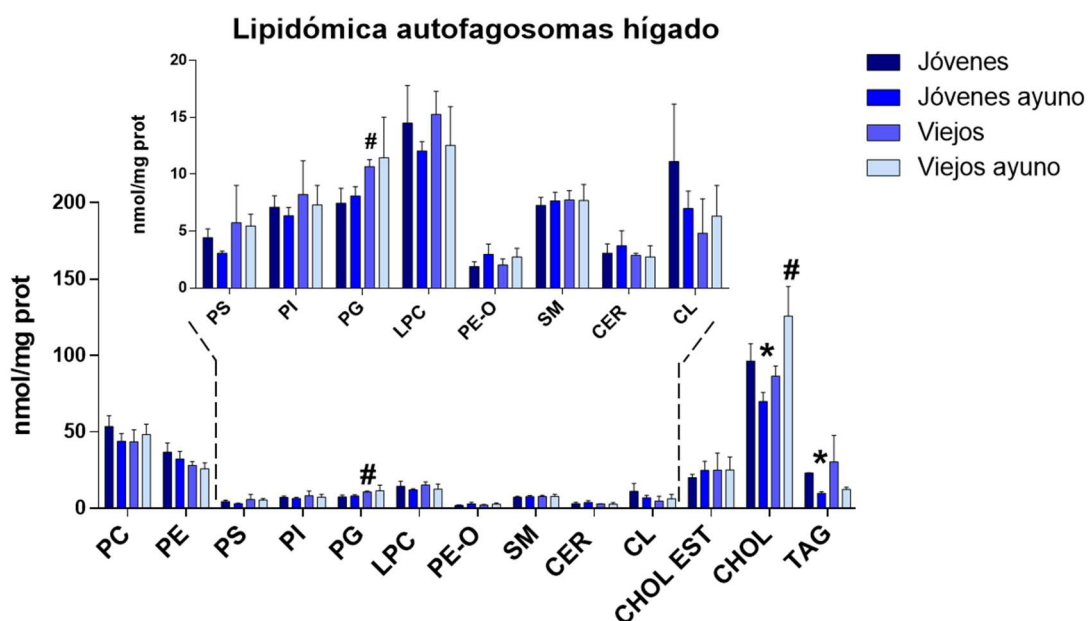
Una vez aislados los orgánulos subcelulares, se llevó a cabo la caracterización de la composición lipídica de las membranas de autofagosomas aisladas a partir de hígados de ratones WT y el estudio de los cambios debidos a la activación de autofagia, mediante ayuno de 6 horas, o al envejecimiento.

Se analizaron fosfolípidos: PC, PS, PE, PC-O y PE-O (éter lípidos con colina y etanolamina respectivamente), LPC, LPE, PI, PG y CL; esfingolípidos: SM y Cer; y CHOL. Además, se determinaron los niveles de TAG, FA y CHOL EST, que correspondían al cargo que portaban estos orgánulos para su degradación en lisosomas.

## Resultados

En primer lugar, se muestran los valores en nmol lípido/mg proteína obtenidos para cada una de las clases lipídicas analizadas, lo que permitió tener una visión general de la composición de las membranas de los autofagosomas. El análisis de las cantidades de las distintas clases lipídicas permitió la comparación de la membrana de los autofagosomas con las membranas de otros orgánulos subcelulares y la membrana plasmática con el fin de responder a algunas de las preguntas aún sin resolver en el estudio de la autofagia: ¿qué orgánulos son los responsables de suministrar los lípidos necesarios para la formación de las membranas de los autofagosomas?; ¿qué características diferenciales tienen las membranas de estos orgánulos de doble membrana?

En primer lugar, y atendiendo a la composición general de las membranas de los autofagosomas, se detectaron como rasgos más característicos la elevada proporción de CHOL (aunque este hecho pudo deberse a que esta clase lipídica se analizó utilizando una metodología distinta al resto de lípidos) y el elevado ratio fosfolípido/esfingolípido en estas membranas. Dentro de los fosfolípidos, la clase lipídica mayoritaria fue PC seguida de PE con unos valores similares, y por último, PS, PI, PG y LPC que presentaban valores más bajos (figura 31). Dentro de los esfingolípidos se observaron unos niveles de SM que eran de la misma magnitud que los de algunos fosfolípidos como PS y PI, y unos valores más bajos de Cer (figura 31).



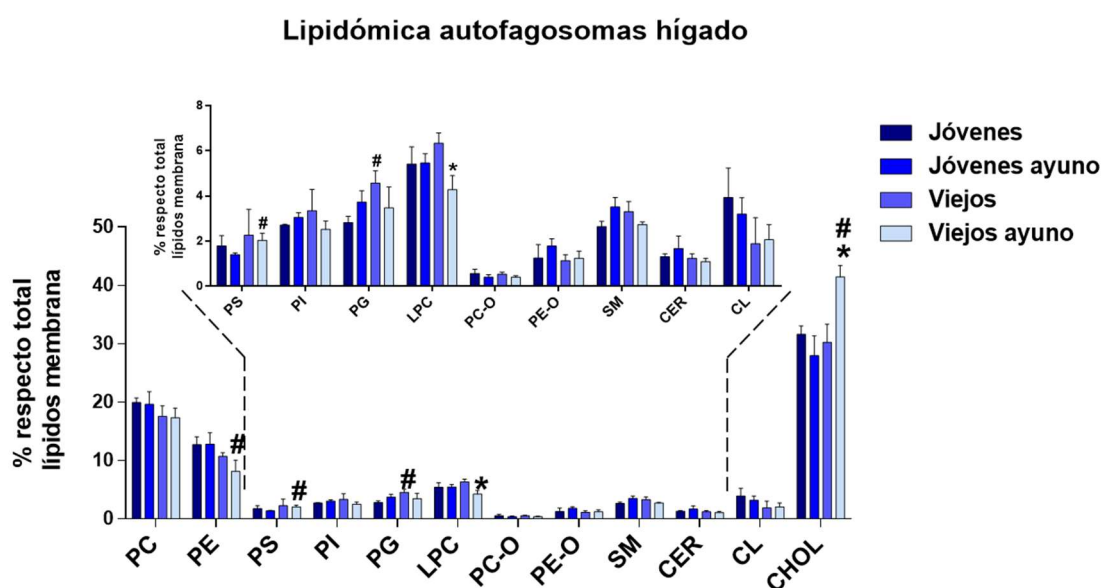
**Figura 31: Caracterización lipidómica de autofagosomas aislados a partir de hígados de ratones WT.** Autofagosomas aislados a partir de animales jóvenes y viejos y con comida ad libitum o tras 6 horas de ayuno. \*  $p < 0,05$  debido al ayuno. #  $p < 0,05$  debido al envejecimiento. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.  $n=3$  para cada condición. PC: Fosfatidilcolina. PE: Fosfatidiletanolamina. PS: Fosfatidilserina. PI: Fosfatidilinositol. PG: Fosfatidilglicerol. LPC: Lisofosfatidilcolina. PE-O: Éter lípidos con etanolamina. SM: Esfingomielina. CER: Ceramida. CL: Cardiolipina. CHOL EST: Ésteres de colesterol. CHOL: Colesterol. TAG: Triacilglicerol.

Mediante comparación de la composición lipídica de los autofagosomas con la de otros orgánulos subcelulares (retículo endoplásmico, mitocondria, membrana plasmática

## Resultados

y lisosoma) descritos en otros trabajos (van Meer and de Kroon 2011) se pudieron establecer similitudes entre estas membranas. Las membranas de los autofagosomas y del retículo endoplásmico tienen niveles parecidos de SM. Las membranas mitocondriales presentan elevadas tasas de PC y PE como ocurre en las membranas de los autofagosomas. Por otro lado, existen semejanzas entre la membrana plasmática y las membranas de los autofagosomas en el ratio fosfolípido/esfingolípido y en la proporción de lisofosfolípidos y PG. En último término, las membranas de los autofagosomas y la de los lisosomas presentan ratios fosfolípido/esfingolípido similares. Por lo tanto, las membranas de los autofagosomas presentan semejanzas con otras membranas subcelulares que se han descrito como “donadoras” de lípidos de membrana para la formación de estos orgánulos, lo que da una idea de la complejidad de los procesos que regulan la síntesis de las membranas de los autofagosomas y el número de orgánulos subcelulares implicados en estos procesos.

Para el estudio de los cambios en las distintas clases lipídicas promovidos por el ayuno y el envejecimiento, se llevó a cabo una normalización de los datos expresándolos como porcentaje respecto al total de lípidos de membrana. Para el cálculo de estos porcentajes se excluyeron los valores de TAG y CHOL EST ya que como se explicó anteriormente estos lípidos constituían el cargo a degradar y no formaban parte de las membranas de los autofagosomas. Además, se detectaron cambios en la cantidad de proteínas en las fracciones aisladas, siendo éstas mayores en condiciones de ayuno (datos no mostrados).



**Figura 32: Porcentajes de las distintas clases lipídicas en autofagosomas aislados a partir de hígados de ratones WT.** Autofagosomas aislados a partir de animales jóvenes y viejos y con comida ad-libitum o tras 6 horas de ayuno. \*  $p < 0,05$  debido al ayuno. #  $p < 0,05$  debido al envejecimiento. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.  $n=3$  para cada condición.

Tanto la activación de la autofagia como el envejecimiento alteraron la composición lipídica de las membranas de los autofagosomas (figura 32). El envejecimiento incrementó los niveles de PG, y la activación de autofagia en animales

## Resultados

viejos disminuyó la proporción de LPC. La abundancia de CHOL aumentó tanto con el envejecimiento como con el ayuno en animales viejos (figura 32).

En el caso del análisis lipidómico de las membranas de los autofagosomas aisladas a partir hígados de ratones WT, los cambios que se observaron fueron los siguientes:

	Cambios con ayuno		Cambios con envejecimiento	
	Jóvenes	Viejos	No ayuno	Ayuno
PE	-	-	↓	-
PS	-	-	-	↑
PG	-	-	↑	-
PE-O	↑	-	-	-
LPC	-	↓	-	-
Chol.	-	↑	-	↑
TAG	↓	-	-	-

**Tabla 6: Cambios en los niveles de distintas clases lipídicas de autofagosomas provocados por la activación de autofagia y el envejecimiento.**

A continuación, se profundizó en el estudio de los cambios obtenidos en algunas clases lipídicas. Este análisis más exhaustivo permitió identificar patrones de cambio (alteraciones en función de la longitud de las cadenas laterales, del grado de insaturación de las mismas, o relación entre los cambios observados en distintas clases lipídicas).

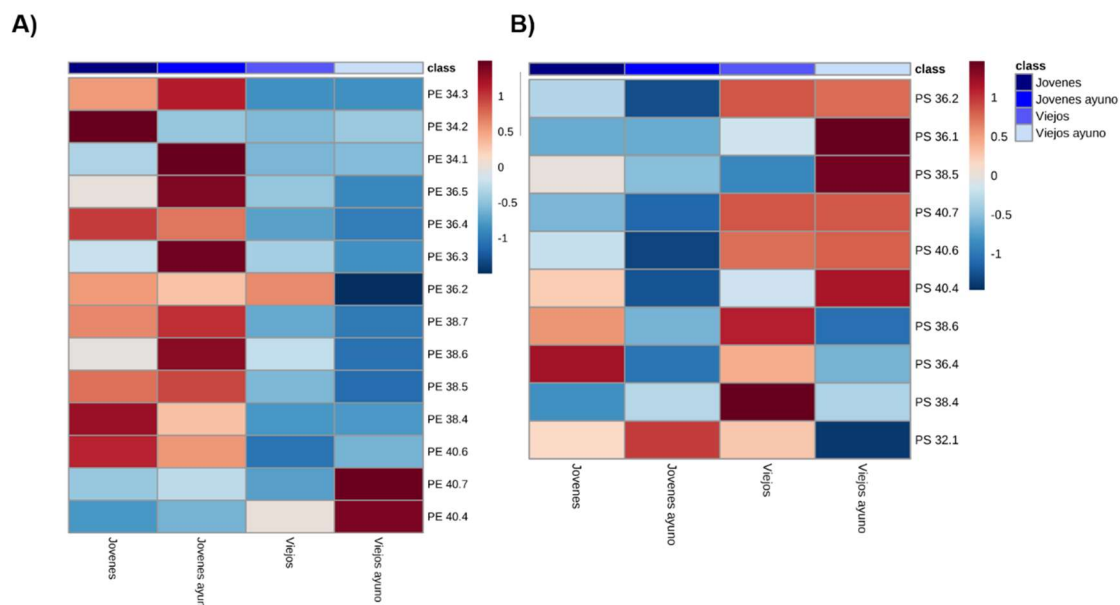
### 5.2.1. Cambios opuestos en PS y PE

Estas clases lipídicas sufrieron alteraciones opuestas debidas al ayuno en animales jóvenes. Mientras que las especies de PE aumentaron (figura 33; panel A), las de PS disminuyeron (figura 33; panel B). Además, estos cambios se producían mayoritariamente en especies que presentaban PUFAs. En animales viejos, el ayuno indujo los cambios contrarios en estas especies, disminución de PE (figura 33; panel A) e incremento de PS (figura 33; panel B).

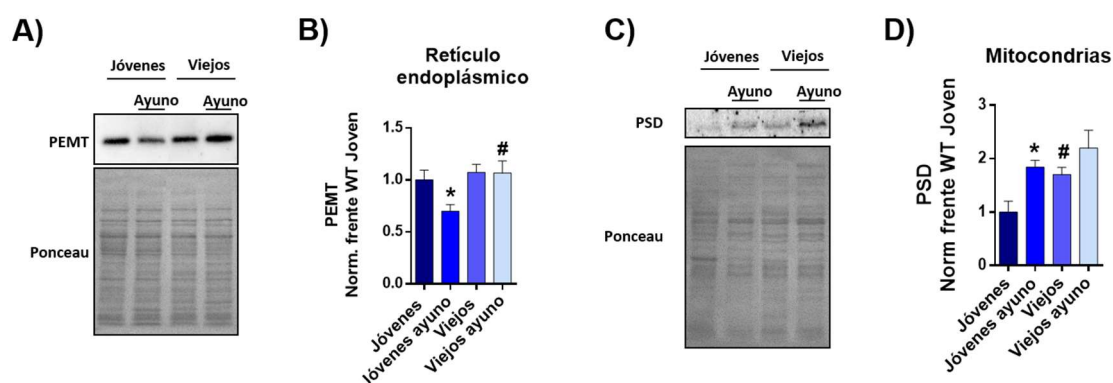
Las alteraciones opuestas en los niveles de PE y PS podrían estar relacionadas con cambios en la remodelación de fosfolípidos debidos al ayuno y al envejecimiento. De todas las enzimas modificadoras de fosfolípidos, las que tendrían un mayor efecto serían la FosfatidilSerina Descarboxilasa (PSD) y la FosfatidilEtanolamina Metil Transferasa (PEMT).

Con el fin de estudiar si los procesos de remodelación de fosfolípidos estaban alterados, se llevaron a cabo experimentos de Western-Blot para estudiar los niveles de enzimas implicadas en la síntesis (PSD; mediante la descarboxilación de PS) y en la degradación (PEMT; mediante la metilación de PE) de PE.

## Resultados



**Figura 33: Alteraciones de PE y PS de las membranas de autofagosomas de hígado debidos al ayuno y al envejecimiento.** Análisis mediante software Metaboanalyst. **A)** Cambios en las especies mayoritarias de PE. **B)** Variaciones en las especies mayoritarias de PS. Se tomaron los valores de las distintas especies lipídicas como el porcentaje respecto al total de lípidos de membrana. n=3 para cada condición.



**Figura 34: Niveles de enzimas modificadoras de fosfolípidos, PEMT y PSD, en retículos endoplásmicos y mitocondrias aislados a partir de hígados de ratones WT.** Las fracciones se aislaron a partir de animales jóvenes y viejos que dispusieron o no de comida durante seis horas. **A)** Western-Blot de retículos endoplásmicos incubados con anticuerpo frente a PEMT. **B)** Cuantificación de la intensidad de señal de PEMT detectada en retículos endoplásmicos. **C)** Western-Blot de mitocondrias incubadas con anticuerpo frente a PSD. **D)** Cuantificación de la intensidad de señal de PSD detectada en mitocondrias. n=3 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía. \* p<0,05 debido al ayuno. # p<0,05 debido al envejecimiento.

La activación de autofagia en animales jóvenes disminuyó los niveles de PEMT en el retículo endoplásmico e incrementó los de PSD en las mitocondrias (figura 34). Por otro lado, el envejecimiento aumentó los niveles de PEMT en condiciones de ayuno, y los de PSD en condiciones basales (con comida ad-libitum) (figura 34; paneles A-D). Estos resultados explicaban los cambios opuestos observados en las especies de PE y PS con PUFAs presentes en las membranas de los autofagosomas. Aún así, hay que tener en

## Resultados

cuenta que los cambios en los niveles de PEMT y PSD se produjeron en orgánulos distintos a los autofagosomas y que, por lo tanto, las alteraciones de PE y PS en las membranas de los mismos podrían estar afectados por otros factores como la transferencia de membrana entre orgánulos subcelulares.

### 5.2.2. Alteraciones de PE-O y PC-O con el ayuno

En la parte superior de la gráfica 35 se encuentran las especies cuyos niveles aumentaron tras la inducción de autofagia en animales jóvenes. En este grupo se englobaron mayoritariamente especies de PE-O, algunas de ellas con PUFAs (figura 35). Este aumento no se produjo tras el ayuno en animales viejos (figura 35). El resto de especies lipídicas (mayoría de PC-O) mostraron un patrón heterogéneo de cambios inducidos por la activación de autofagia y el envejecimiento (figura 35).

### 5.2.3. Modificaciones de TAG y FA

En animales jóvenes, el ayuno disminuyó los niveles de TAG y de FA (figura 36), los cuales, además, decrecieron con el envejecimiento. La bajada de TAG se produjo en todas las formas mayoritarias (formas con pocas insaturaciones; datos nos mostrados). En cuanto a los cambios en FA, se observaron en la mayoría de las especies, tanto en ácidos grasos saturados y monoinsaturados (que eran los mayoritarios; datos no mostrados), como en los poliinsaturados.

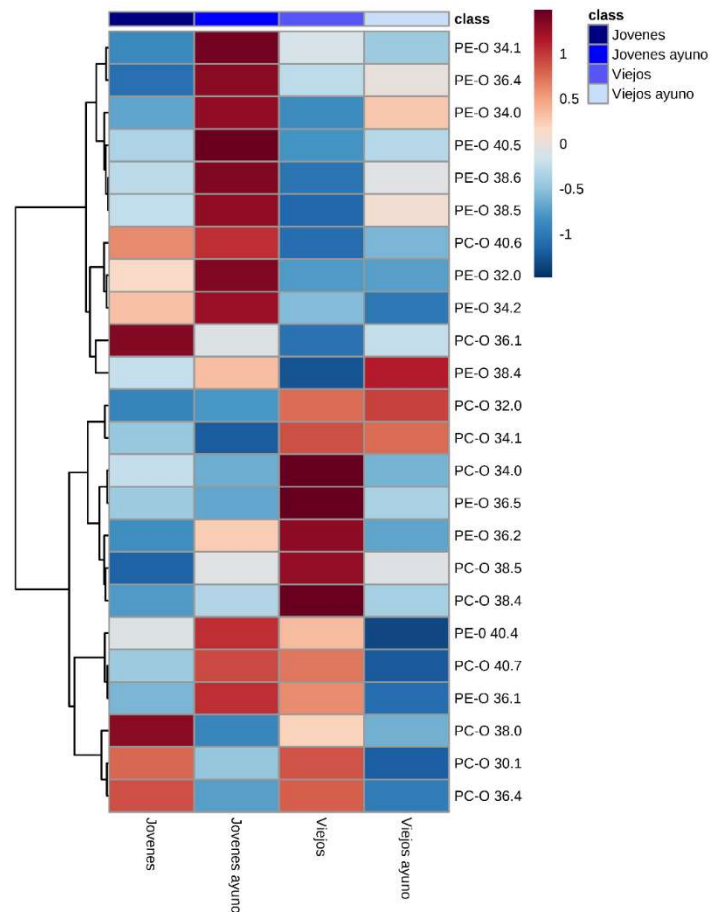
Estos resultados demostraron que la activación de la autofagia y el envejecimiento modificaron la composición lipídica de la membrana de los autofagosomas. Se observaron alteraciones de PE, PS, PG, LPC, éter lípidos (fundamentalmente PE-O) y CHOL. Además, se demostró que algunos de estos cambios podrían estar mediados por alteraciones en la expresión de enzimas modificadoras de fosfolípidos, PSD y PEMT. Algunos de estas alteraciones podrían modular la actividad de la autofagia (cambios en PE y PE-O).

## 5.4. Lipidómica de autofagosomas de hígado WT y PK KO tras activación de autofagia. Efecto de la ausencia de Parkin y del envejecimiento.

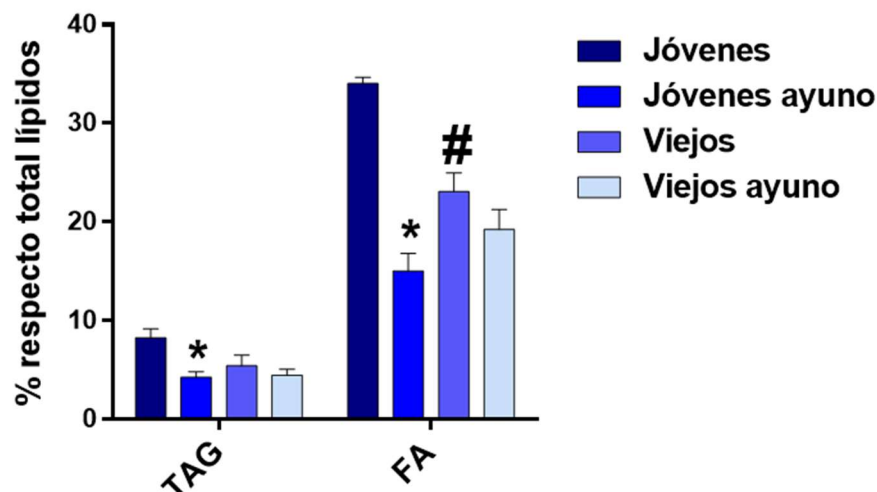
A continuación, se estudió la composición lipídica de las membranas de autofagosomas aislados de ratones WT y PK KO con el fin de estudiar los cambios inducidos por la delección de Parkin y por el envejecimiento. En este apartado, todos los autofagosomas se aislaron en condiciones de ayuno.

En primer lugar, se muestran los valores de las distintas clases de fosfolípidos y esfingolípidos detectadas expresadas como porcentaje del total de lípidos de membrana (figura 37; paneles A y B).

## Resultados



**Figura 35: Cambios en PE-O y PC-O detectados en las membranas de autofagosomas e inducidos por la activación de autofagia y el envejecimiento.** Análisis mediante software Metaboanalyst. Se tomaron los valores de las distintas especies lipídicas como el porcentaje respecto al total de lípidos de membrana. n=3 para cada condición.

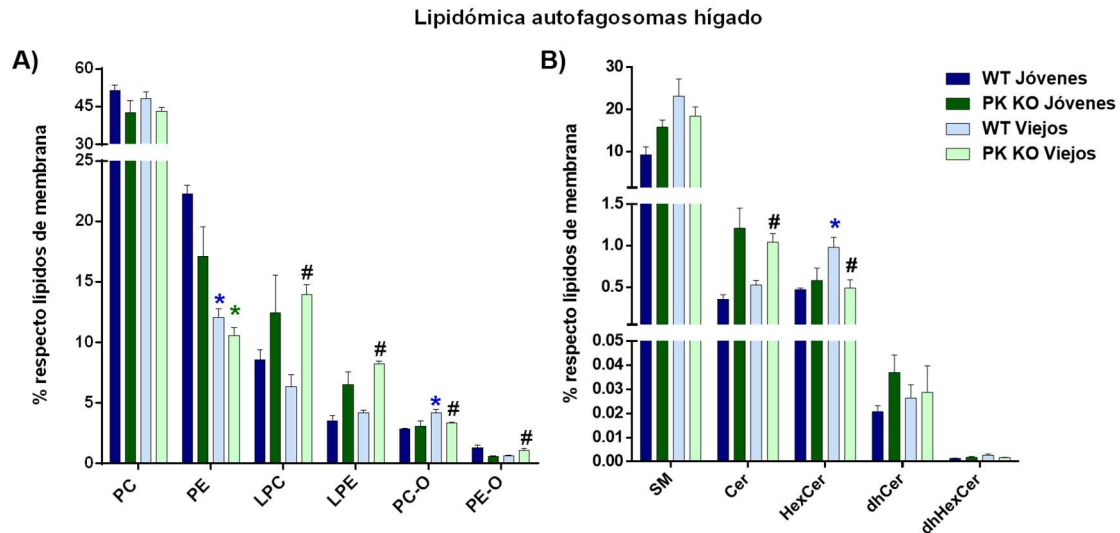


**Figura 36: Porcentajes de TAG y FA en autofagosomas. Cambios debidos a la activación de autofagia y al envejecimiento.** Se representa el porcentaje respecto al total de lípidos. n=3 para cada condición.



## Resultados

En animales jóvenes, la eliminación de Parkin modificó la proporción de fosfolípidos y esfingolípidos, aunque no eran significativos a nivel de clase. Los autofagosomas de animales PK KO presentaban menores cantidades de PC, PE, PE-O y mayores de LPC, LPE SM, Cer y HexCer (figura 37).



**Figura 37: Caracterización lipidómica de autofagosomas aislados a partir de hígados de ratones WT y PK KO.** Se aislaron los autofagosomas a partir de animales jóvenes y viejos y tras 6 horas de ayuno. **A)** Porcentaje de las distintas clases de fosfolípidos detectadas respecto al total de lípidos de membrana. **B)** Porcentaje de las distintas clases de esfingolípidos detectadas respecto al total de lípidos. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en ratones WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en ratones PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak. PC: Fosfatidilcolina. PE: fosfatidiletanolamina. LPC: Lisofosfatidilcolina. LPE: Lisofosfatidiletanolamina. PC-O: Éter lípidos con colina. PE-O: Éter lípidos con etanolamina. SM: Esfingomielina. Cer: Ceramida. HexCer: Hexosilceramida. dhCer: dihidroCeramida. dhHexCer: dihidroHexosilceramida.

Por otro lado, la eliminación de Parkin en animales viejos y el envejecimiento tanto en ratones WT como en ratones PK KO alteraron significativamente los niveles de distintas clases lipídicas (tabla 7).

### 5.4.1. Alteraciones de PE con el envejecimiento

Las especies mayoritarias de PE presentaban PUFAs (figura 38). La carencia de Parkin en animales jóvenes disminuyó la proporción de distintas especies de PE. Además, el envejecimiento disminuyó las cantidades de la mayoría de las especies tanto en autofagosomas de ratones WT como PK KO (figura 38).

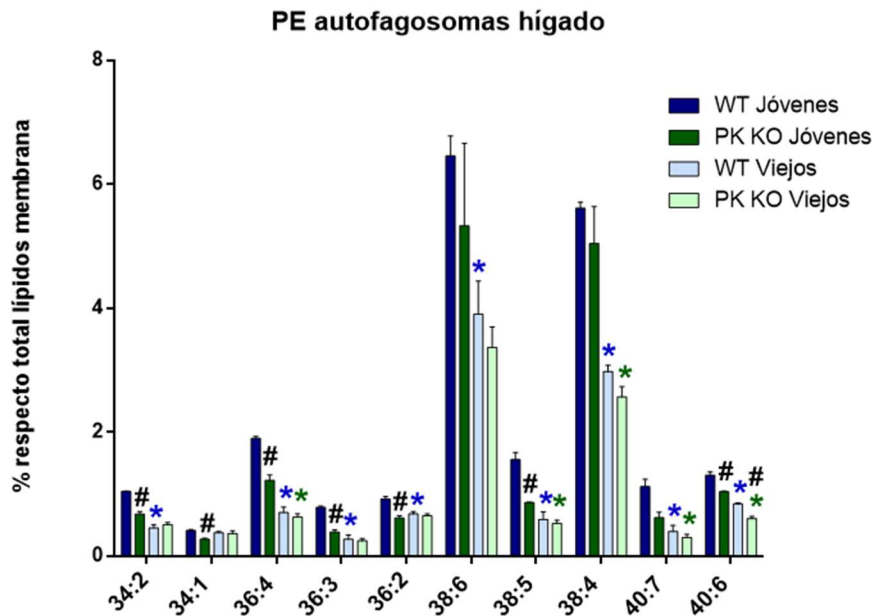
La alteración de los niveles de PE en animales jóvenes debida a la ausencia de Parkin pudo deberse a cambios en los mecanismos de transferencia de membrana o en los niveles/actividad de enzimas modificadoras de fosfolípidos. La disminución de PE con el envejecimiento en los dos tipos de animales indicaba que los procesos que la producían eran independientes de Parkin.

## Resultados

En este análisis no se midieron PS y, por lo tanto, no se pudo determinar si la disminución de PE iba acompañada de incrementos de PS. Sin embargo, y dado que se produjeron disminuciones en los niveles de especies de PE con PUFAs, se estudió si estos cambios se debían a diferencias en PSD y PEMT (figura 45).

Cambios con ausencia de Parkin		Cambios con envejecimiento		
	Jóvenes	Viejos	WT	PK KO
PE	-	-	↓	↓
PC-O	-	↓	↑	-
PE-O	-	↑	-	-
LPC	-	↑	-	-
LPE	-	↑	-	-
Cer	-	↑	-	-
HexCer	-	↓	↑	-
CHOL EST	↑	↑	-	-
TAG	↓	-	↓	-

**Tabla 7: Cambios en distintas clases lipídicas en autofagosomas de hígados de ratones WT y PK KO debidos a la activación de autofagia y al envejecimiento.**



**Figura 38: Especies de PE de autofagosomas de ratones WT y PK KO tras ayuno de 6 horas. Cambios con la supresión de Parkin y el envejecimiento.** Se indican la suma del número de carbonos e insaturaciones de las cadenas laterales. Solo se muestran las formas mayoritarias. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK

## Resultados

KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=3$  para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.

### 5.4.2. Cambios en la proporción de PC-O y PE-O

El envejecimiento aumentó la abundancia de especies de PC-O con ácidos grasos cortos, sobre todo en autofagosomas aislados de animales WT (figura 39; panel A). Estos incrementos eran independientes del grado de insaturación de los ácidos grasos. La disminución de los niveles de PC-O en los orgánulos aislados de animales PK KO viejos iría en la línea de diversos trabajos que han relacionado las enfermedades neurodegenerativas con menores niveles de éter lípidos (Igarashi, Ma et al. 2011).

En cuanto a las distintas especies de PE-O, los cambios debidos a la eliminación de Parkin y el envejecimiento se produjeron en las dos especies mayoritarias, 34:0 y 38:7. Éstas presentaban menores cantidades en autofagosomas de animales PK KO jóvenes, y el envejecimiento alteró de forma opuesta los niveles de la especie 34:0 en animales WT y PK KO (disminución en WT e incremento en PK KO) (figura 39; panel B). En este caso, los cambios eran independientes de la longitud o el grado de insaturación de los ácidos grasos y contrastaban con los obtenidos para PC-O, ya que en este caso los valores eran mayores en autofagosomas de animales PK KO viejos.

### 5.4.3. Modificaciones en los niveles de LPC y LPE en PK KO

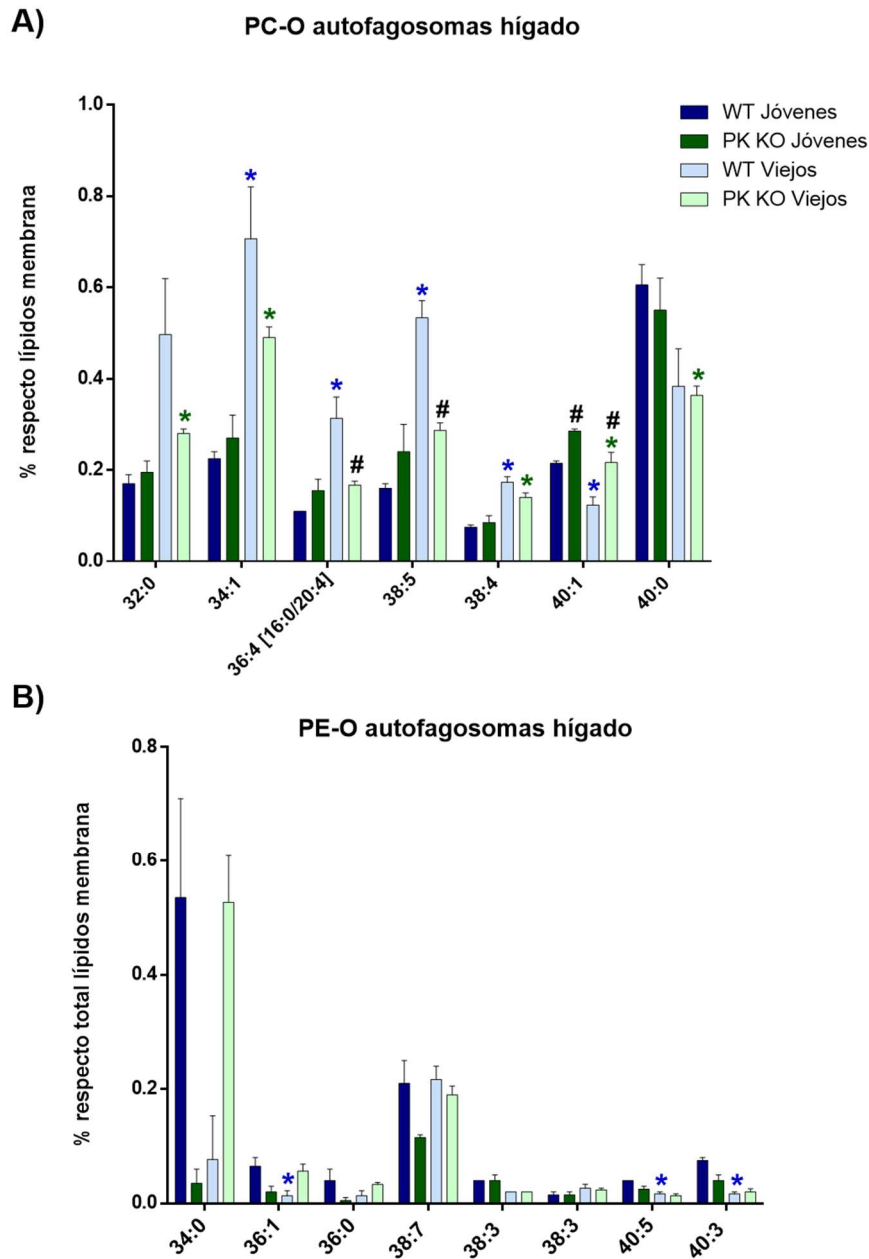
El análisis de las distintas especies de lisofosfolípidos permitió separar dos grupos en función del grado de insaturación del ácido graso. En la parte superior del panel A de la figura 40, se encuadraron las especies de LPC y LPE con ácidos grasos saturados (en este grupo también se encontraba LPE 20:4). Los niveles más altos de este grupo de lisofosfolípidos se detectaron en autofagosomas de ratones PK KO viejos. Por otra parte, los lisofosfolípidos con ácidos grasos insaturados presentaban mayores cantidades en autofagosomas de animales PK KO, tanto jóvenes como viejos (figura 40, panel A).

En el panel B de la figura 40 se muestran los cambios provocados por la delección de Parkin y el envejecimiento en cada uno de estos grupos. Estos factores promovieron alteraciones análogas en LPC y LPE y que eran dependientes del grado de insaturación del ácido graso. Los lisofosfolípidos con ácidos grasos saturados eran más abundantes en autofagosomas de ratones PK KO y aumentaban con el envejecimiento (figura 40; panel B). Por otro lado, los autofagosomas de ratones PK KO tenían más lisofosfolípidos con ácidos grasos insaturados (figura 40; panel B).

### 5.4.4. Cambios en Cer

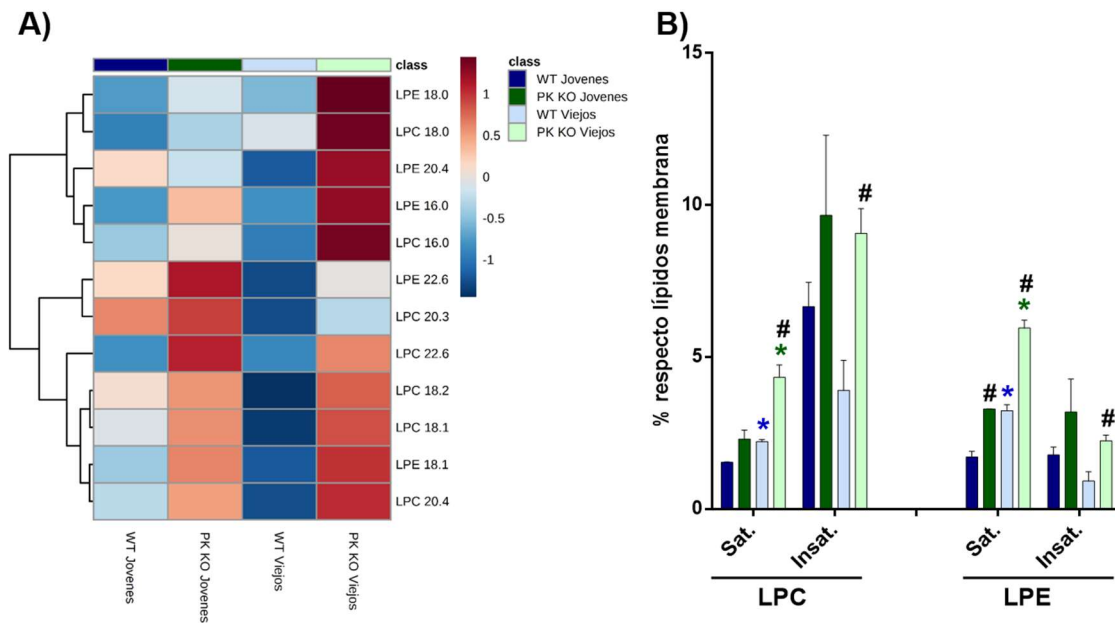
Se detectaron dos patrones de cambio en función de la longitud del ácido graso: Cer con ácidos grasos cortos (34:1; 36:1 y 38:1) y largos (40:1 y 42:1) (figura 41; panel A).

## Resultados



**Figura 39: Especies de PC-O y PE-O de autofagosomas de ratones WT y PK KO tras ayuno de 6 horas. Alteraciones con la eliminación de Parkin y el envejecimiento. A) Porcentajes de especies de PC-O. B) Porcentajes de especies de PE-O.** Se indican la suma del número de carbonos e insaturaciones de los ácidos grasos y en algunas especies entre corchetes la composición de cada uno de ellos. Solo se muestran las formas mayoritarias. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la delección de Parkin.  $n=3$  para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.

## Resultados



**Figura 40: Especies de LPC y LPE de autofagosomas de ratones WT y PK KO.** **A)** Análisis mediante software Metaboanalyst de las especies de LPC y LPE detectadas. Se indica el número de carbonos e insaturaciones del ácido graso. **B)** Porcentaje de LPC y LPE con ácidos grasos saturados o insaturados respecto al total de lípidos de membrana. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=3$  para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.

Las especies con menor número de carbonos incrementaron sus niveles con el envejecimiento, tanto en autofagosomas aislados de animales WT como de animales PK KO, siendo el aumento mayor en autofagosomas de animales PK KO (figura 41; panel B). Por el contrario, las formas largas (40:1 y 42:1) eran más abundantes en autofagosomas de animales PK KO jóvenes y el envejecimiento disminuyó sus niveles (figura 41; panel B).

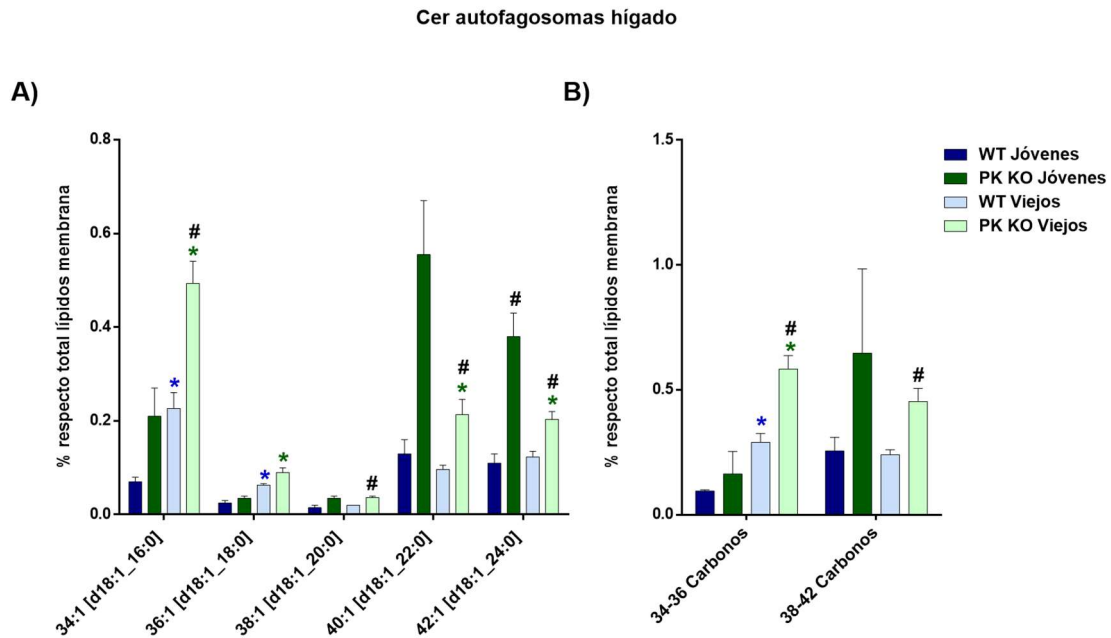
Los cambios diferenciales detectados en función de la longitud del ácido graso pudieron deberse a modificaciones en la síntesis/remodelación de esta clase lipídica inducidas por cambios en la expresión/niveles/actividad de enzimas remodeladoras de esfingolípidos como las Ceramida Sintetas (CerS) o las elongasas.

### 5.4.5. Alteraciones de CHOL EST y TAG

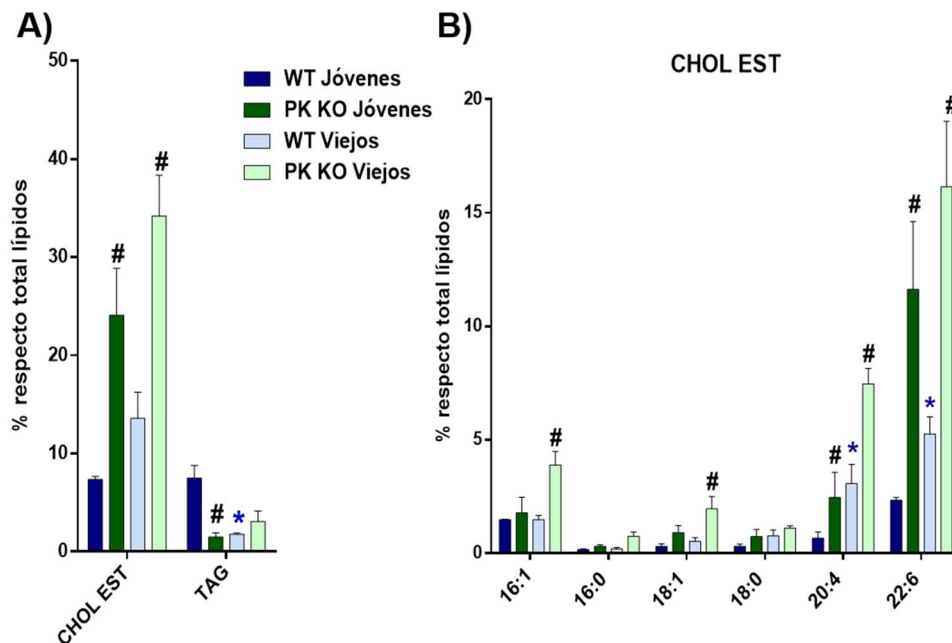
La eliminación de Parkin aumentó la proporción de CHOL EST y disminuyó la de TAG en animales jóvenes (figura 42; panel A). Además, la supresión de Parkin incrementó los CHOL EST con PUFAs (20:4 y 22:6) (figura 42; panel B). Por otro lado, el envejecimiento también elevó los niveles de estas especies, sobre todo en autofagosomas de animales WT (figura 42; panel B). La disminución de TAG con el envejecimiento ya se había observado en el análisis lipídico de las membranas de autofagosomas de ratones WT (figura 36). Estos cambios indicaron que la delección de

## Resultados

Parkin alteraba los procesos de lipofagia al variar la proporción de CHOL EST y de TAG como cargo de los autofagosomas (figura 42). La caracterización de la composición de las gotas lipídicas de hígados de animales WT y PK KO permitiría demostrar si la ausencia de Parkin también afecta a la composición de los mismos.



**Figura 41: Especies de Cer de autofagosomas de ratones WT y PK KO.** **A)** Niveles de las distintas especies de Cer detectadas. Se indican la suma del número de carbonos e insaturaciones de las cadenas laterales. **B)** Niveles de las distintas especies de Cer detectadas en función de la longitud del ácido graso. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n = 3$  para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.



## Resultados

**Figura 42: Niveles de CHOL EST y TAG de autofagosomas de hígado. Cambios con el envejecimiento y la eliminación de Parkin.** A) Porcentajes de CHOL EST y TAG detectados respecto al total de lípidos. B) Porcentaje de las distintas especies de CHOL EST detectadas respecto al total de lípidos. Se indican la suma del número de carbonos e insaturaciones del ácido graso. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=3$  para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.

El análisis lipídico de los autofagosomas de hígado de ratones WT y PK KO permitió detectar cambios en la composición de las membranas de estos orgánulos promovidos por la ausencia de Parkin y el envejecimiento. Se detectaron alteraciones en PE con PUFAs, éter lípidos, lisofosfolípidos y Cer. Los cambios en lisofosfolípidos dependían del grado de insaturación de los ácidos grasos, mientras que los detectados en Cer dependían de la longitud de los mismos.

### 5.5. Lipidómica de mitocondrias de hígado WT y PK KO tras activación de autofagia. Efectos de la eliminación de Parkin y del envejecimiento.

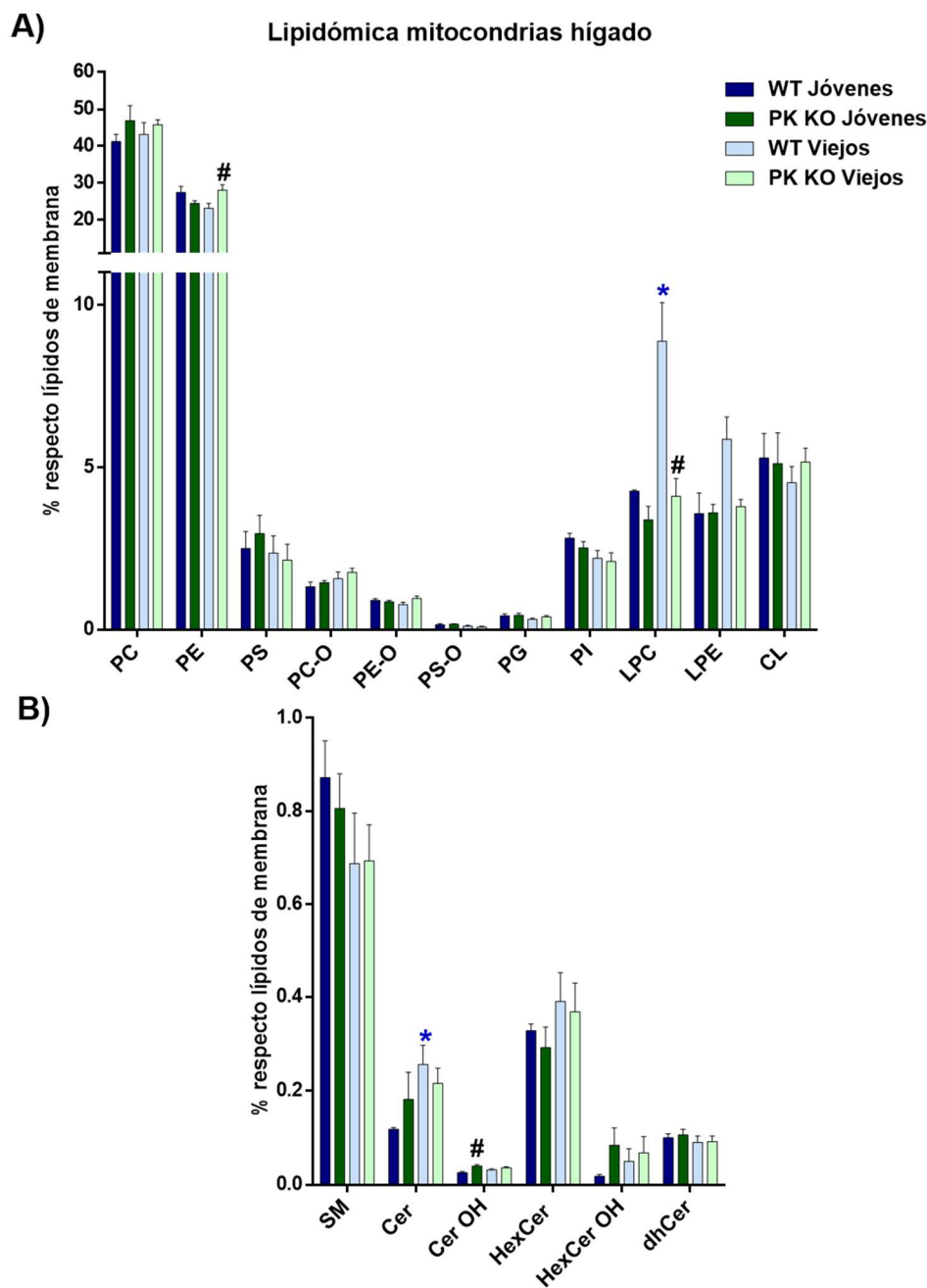
Los porcentajes de CL detectados iban en la línea de otros trabajos en los que se ha analizado la composición lipídica de las membranas de las mitocondrias. Este lípido constituye un marcador del grado de enriquecimiento de los protocolos de aislamiento de mitocondrias debido a su localización casi exclusiva en este orgánulo.

La delección de Parkin y el envejecimiento alteraron la abundancia de distintas clases de fosfolípidos (PE, LPC, PS-O) y esfingolípidos (Cer e hidroxilación de Cer) al igual que ocurría en el análisis lipídico de las membranas de autofagosomas. Sin embargo, no se observaron las mismas alteraciones en los dos orgánulos; no cambiaban las mismas especies ni los cambios iban en el mismo sentido (figuras 37 y 43). Esta selectividad de modificaciones lipídicas en respuesta a la eliminación de Parkin y al envejecimiento en distintos orgánulos subcelulares podría implicar que la activación de autofagia alteraba las membranas de los mismos de forma independiente. Todo ello podría ser explicado por el hecho de que un mismo estímulo, el ayuno en este caso, puede promover distintos procesos en diferentes orgánulos, que inevitablemente, requieren remodelaciones diferentes de los lípidos de membrana de estos orgánulos.

Los cambios que se observaron en la composición lipídica de mitocondrias de hígado debidas al envejecimiento y a la supresión de Parkin se muestran en la tabla 8.

El envejecimiento disminuyó los niveles de PS-O (éter lípidos con serina; grupo de éter lípidos muy minoritario) en mitocondrias de animales PK KO. Los otros dos grupos de éter lípidos, PC-O y PE-O, no sufrieron cambios ni con la eliminación de Parkin ni con el envejecimiento; indicando que la proporción de estas clases lipídicas estaba altamente regulada en estas membranas. Por otro lado, la ausencia de Parkin incrementó la hidroxilación de HexCer en los animales viejos (en estas condiciones también eran más intensos los procesos de hidroxilación de Cer).

## Resultados



**Figura 43: Caracterización lipidómica de mitocondrias aisladas a partir de hígados de ratones WT y PK KO.** Se aislaron las mitocondrias a partir de animales jóvenes y viejos y tras 6 horas de ayuno. **A)** Porcentaje de las distintas clases de fosfolípidos detectadas respecto al total de lípidos de membrana. **B)** Porcentaje de las distintas clases de esfingolípidos detectadas respecto al total de lípidos de membrana. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en ratones WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en ratones PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=5$  para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak. PC: Fosfatidilcolina. PE: Fosfatidiletanolamina. PS: Fosfatidilserina. PC-O: Éter lípidos con colina. PE-O: Éter lípidos con etanolamina. PS-O: Éter lípidos con serina. PG:



## Resultados

Fosfatidilglicerol. PI: Fosfatidilinositol. LPC: Lisofosfatidilcolina. LPE: Lisofosfatidiletanolamina. CL: Cardiolipina. SM: Esfingomielina. Cer: Ceramida. Cer OH: Ceramida hidroxilada. HexCer: Hexosilceramida. HexCer OH: Hexosilceramida hidroxilada. dhCer: dihidroCeramida.

Cambios con ausencia de Parkin			Cambios con envejecimiento	
	Jóvenes	Viejos	WT	PK KO
PE	-	↑	-	-
PS-O	-	-	-	↓
LPC	-	↓	↑	-
LPE	-	↓	↑	-
Cer	-	-	↑	-
CerOH	-	↑	-	-
HexCer OH	-	↑	-	-

**Tabla 8: Cambios en los niveles de distintas clases lipídicas en mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO inducidos por la activación de autofagia y el envejecimiento.**

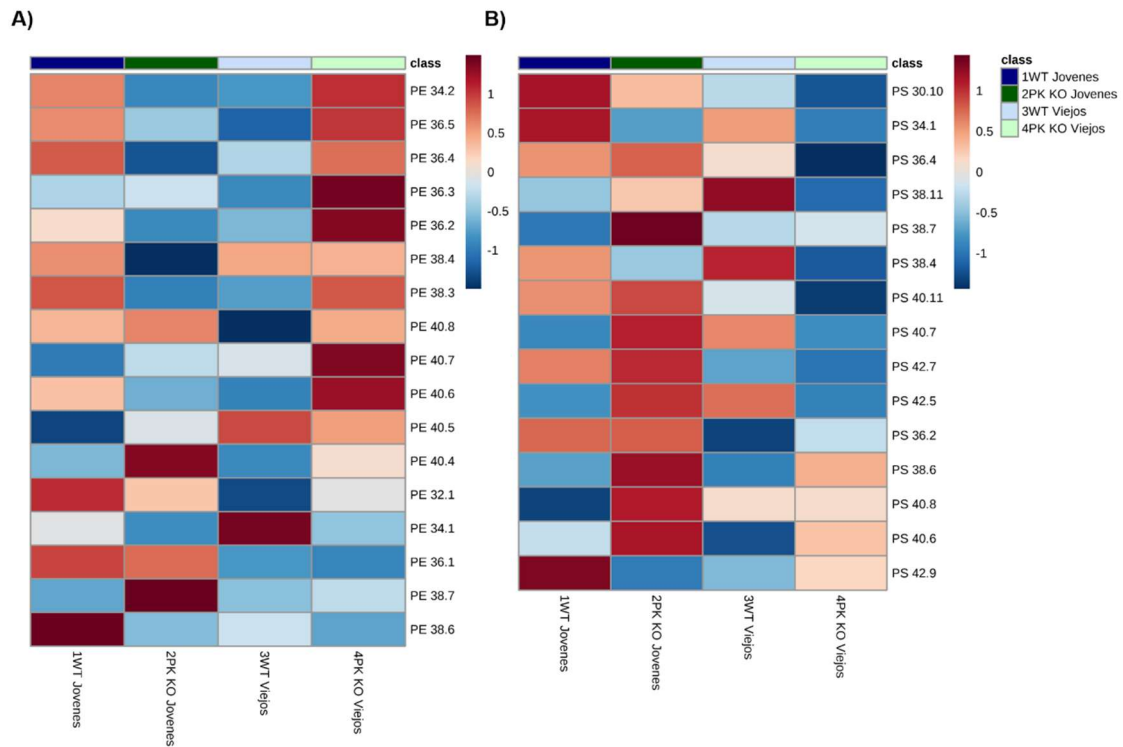
### 5.5.1. Cambios en los niveles de PE

Las mitocondrias de animales PK KO viejos presentaban valores más altos de numerosas especies de PE, entre las que se encontraban aquellas con PUFAs (36:4; 38:6; 38:4; 40:6 entre otras) (figura 44; panel A). Por otro lado, el envejecimiento disminuyó la abundancia de las mismas especies en mitocondrias de animales WT. En cambio, se detectaron menores niveles de especies de PS con PUFAs con el envejecimiento en animales PK KO (figura 44; panel B).

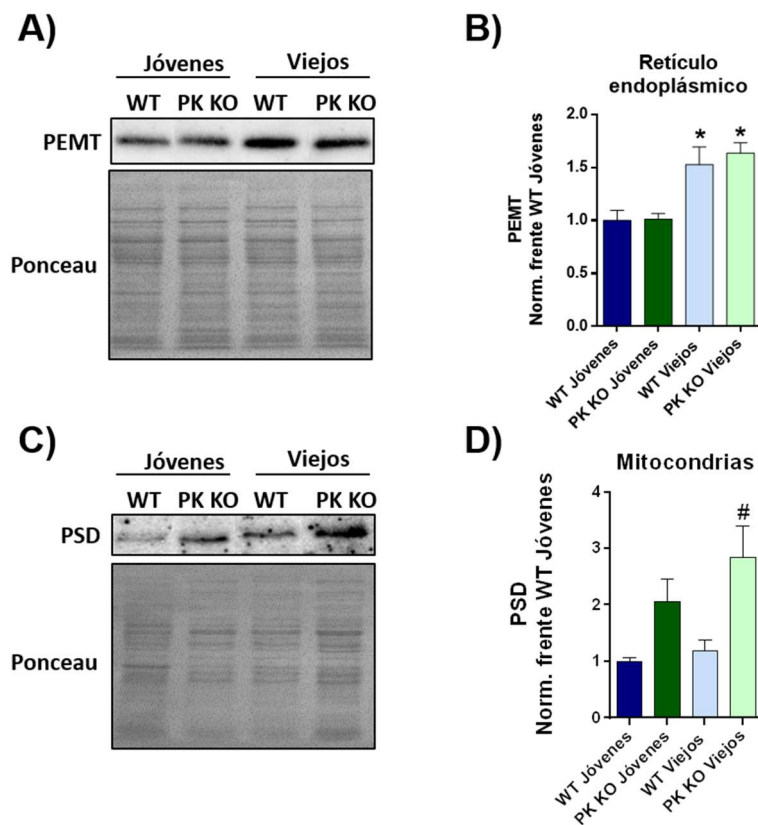
Al detectar cambios en especies de PE y PS con PUFAs, se analizaron los niveles de enzimas modificadoras de fosfolípidos, PEMT y PSD, de animales WT y PK KO.

El envejecimiento aumentó la señal de PEMT en los dos tipos de animales (figura 45; paneles A y B). La cantidad de PSD era mayor en mitocondrias de animales PK KO, lo que explicaría el incremento de PE en las mitocondrias de estos animales (figura 45; panel C y D). Sin embargo, el aumento de PE en mitocondrias de animales PK KO viejos no se producía en los autofagosomas, en los que se observaba una disminución de esta clase lipídica (figura 38). En animales WT, la disminución de los niveles de PE en las membranas de los autofagosomas y las mitocondrias podría deberse a la mayor tasa de degradación de esta clase lipídica causada por el incremento de los niveles de la enzima PEMT. En los animales PK KO, las mayores cantidades de PE en las mitocondrias irían asociadas a la mayor expresión de PSD, mientras que la falta de incremento en los autofagosomas podría deberse a la disfunción de los procesos de transferencia de membrana entre los dos orgánulos.

## Resultados



**Figura 44: Especies de PE y PS de mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO. Modificaciones con la ausencia de Parkin y el envejecimiento.** Análisis mediante software Metaboanalyst. **A)** Cambios en los niveles de las especies mayoritarias de PE. **B)** Cambios en las especies mayoritarias de PS. Se indican la suma del número de carbonos e insaturaciones de las cadenas laterales. n=5 para cada condición.



## Resultados

**Figura 45: Niveles de PEMT y PSD en retículos endoplásmicos y mitocondrias aislados a partir de hígados de ratones WT y PK KO.** Las fracciones se aislaron a partir de animales jóvenes y viejos tras ayuno de seis horas. **A)** Western-Blot de retículos endoplásmicos incubados con anticuerpo frente a PEMT. **B)** Cuantificación de la intensidad de señal de PEMT detectada en retículos endoplásmicos. **C)** Western-Blot de mitocondrias incubadas con anticuerpo frente a PSD. **D)** Cuantificación de la intensidad de señal de PSD detectada en mitocondrias. n=3 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía. \*  $p < 0,05$  debido al envejecimiento. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.

### 5.5.2. Alteraciones en LPC y LPE en PK KO

Los cambios en las especies de lisofosfolípidos dependieron del grado de insaturación del ácido graso. LPC con ácidos grasos saturados incrementaron sus niveles con el envejecimiento, sobre todo, en mitocondrias aisladas a partir de animales PK KO (figura 46; paneles A y B). Las modificaciones en LPC y LPE con ácidos grasos insaturados fueron de mayor magnitud. El envejecimiento aumentó los niveles de estas especies de LPC y LPE solo en animales WT (figura 46; paneles A y B).

El envejecimiento y la eliminación de Parkin promovieron cambios distintos en las cantidades de lisofosfolípidos en autofagosomas y en mitocondrias. Los porcentajes de LPC y LPE en autofagosomas eran mayores en orgánulos de animales PK KO, tanto jóvenes como viejos (figura 47; paneles A y C). Por otro lado, el envejecimiento incrementó LPC y LPE en mitocondrias de animales WT (figura 47; paneles A y C).

El análisis por separado de LPC y LPE con ácidos grasos saturados o insaturados en los dos orgánulos puso de manifiesto que la respuesta al envejecimiento y a la supresión de Parkin era diferente en función del grado de insaturación del ácido graso y del orgánulo subcelular (figura 47; paneles B y D). Los lisofosfolípidos con ácidos grasos saturados aumentaban en los autofagosomas con el envejecimiento sobre todo en animales PK KO.

En cuanto a LPC y LPE con ácidos grasos insaturados, se observaron cambios opuestos en los dos orgánulos debidos al envejecimiento y a la eliminación de Parkin (figura 47; paneles B y D). Mientras que en los autofagosomas de animales viejos la proporción de estas especies lipídicas era mayor en PK KO, en las mitocondrias ocurría lo contrario, LPC y LPE con ácidos grasos insaturados presentaban valores más altos en orgánulos aislados de animales WT (figura 47; paneles B y D).

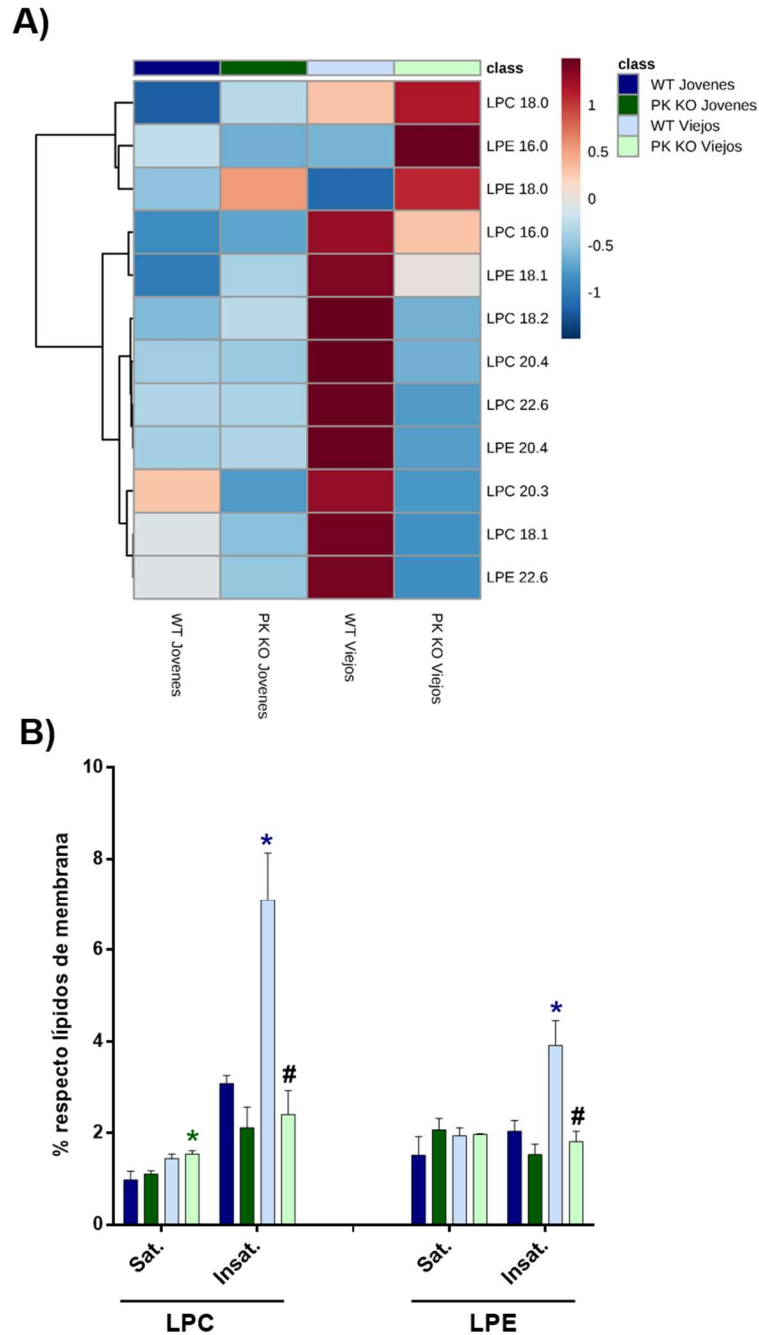
Estas modificaciones pusieron de manifiesto que existía una regulación orgánulo dependiente de LPC y LPE en respuesta al envejecimiento y a la delección de Parkin en autofagosomas y en mitocondrias.

### 5.5.3. Cambios en Cer

Las alteraciones en las distintas especies de Cer eran distintas en función de la longitud de la cadena lateral. Las Cer con ácidos grasos cortos (34:1 y 36:1) aumentaron sus niveles en respuesta al envejecimiento en animales WT. En especies de Cer con ácidos

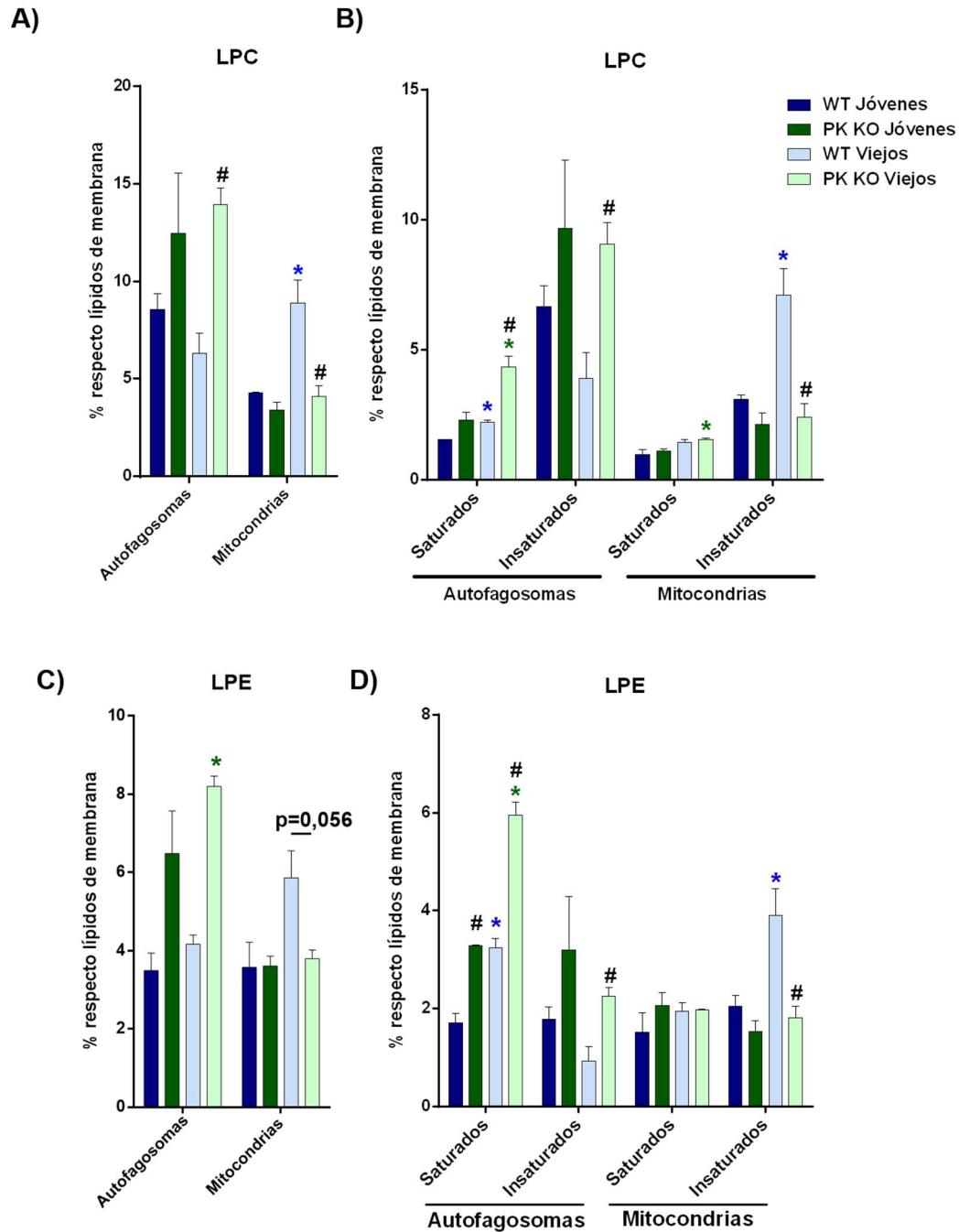
## Resultados

grasos más largos, como la especie 40:1, la eliminación de Parkin incrementó los niveles en animales jóvenes (figura 48; panel A). En el panel B de la figura 48 se muestran por separado las especies de Cer en función de la longitud del ácido graso (34-36 carbonos ó 38-44 carbonos).



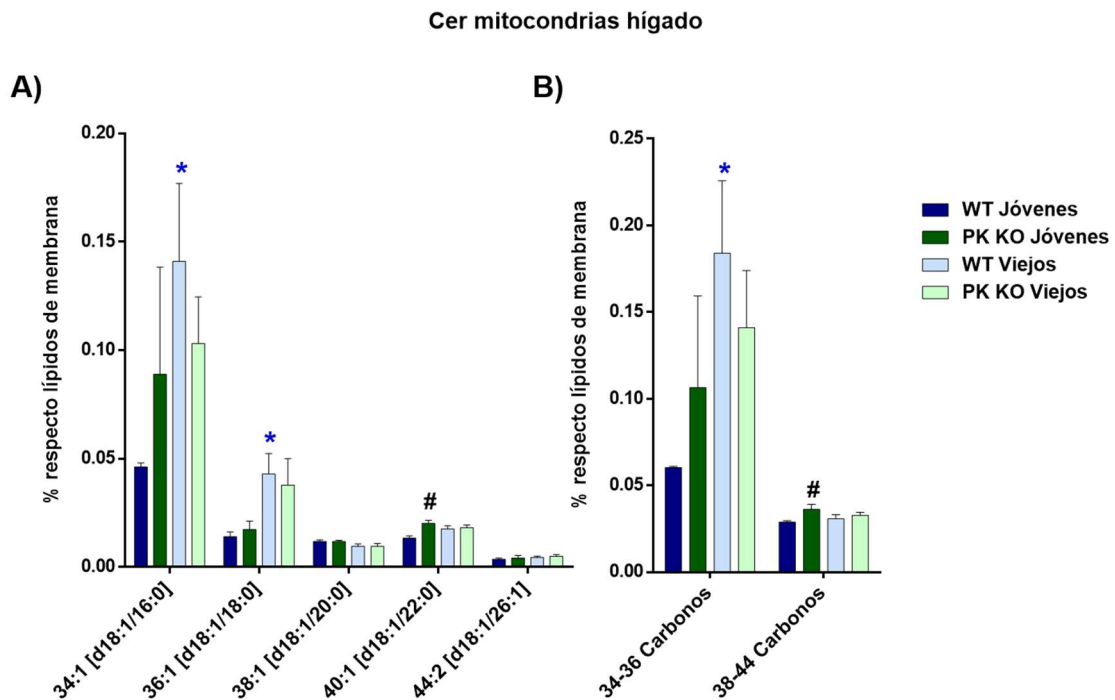
**Figura 46: Especies de LPC y LPE de mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO. A)** Análisis mediante software Metaboanalyst de las distintas especies de LPC y LPE. Se indica el número de carbonos e insaturaciones del ácido graso. **B)** Porcentajes de LPC y LPE con ácidos grasos saturados o insaturados respecto al total de lípidos de membrana. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=5$  para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.

## Resultados



**Figura 47: Comparación de los cambios en LPC y LPE en autofagosomas y mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO.** A) Porcentajes de LPC detectados en autofagosomas y mitocondrias. B) Porcentajes de LPC con ácidos grasos saturados o insaturados tanto en autofagosomas como en mitocondrias. C) Porcentajes de LPE detectados en autofagosomas y mitocondrias. D) Porcentajes de LPE con ácidos grasos saturados o insaturados tanto en autofagosomas como en mitocondrias. Se representan los porcentajes respecto al total de lípidos de membrana. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la eliminación de Parkin.  $n=3$  para los autofagosomas y  $n=5$  para las mitocondrias. Análisis estadístico mediante t de Student y análisis Holm-Sidak.

## Resultados



**Figura 48: Especies de Cer de mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO. Alteraciones con la supresión de Parkin y el envejecimiento. A)** Porcentajes de las distintas especies de Cer respecto al total de lípidos de membrana. Se indica el número de carbonos e insaturaciones de las cadenas laterales. Solo se muestran las formas mayoritarias. **B)** Porcentajes de Cer con ácidos grasos cortos (34-36 carbonos) o largos (38-44 carbonos) respecto al total de lípidos de membrana. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n = 5$  para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.

El envejecimiento y la carencia de Parkin provocaron cambios distintos en los niveles de Cer de autofagosomas y mitocondrias (figura 49; panel A), al igual que ocurría en el caso de los lisofosfolípidos.

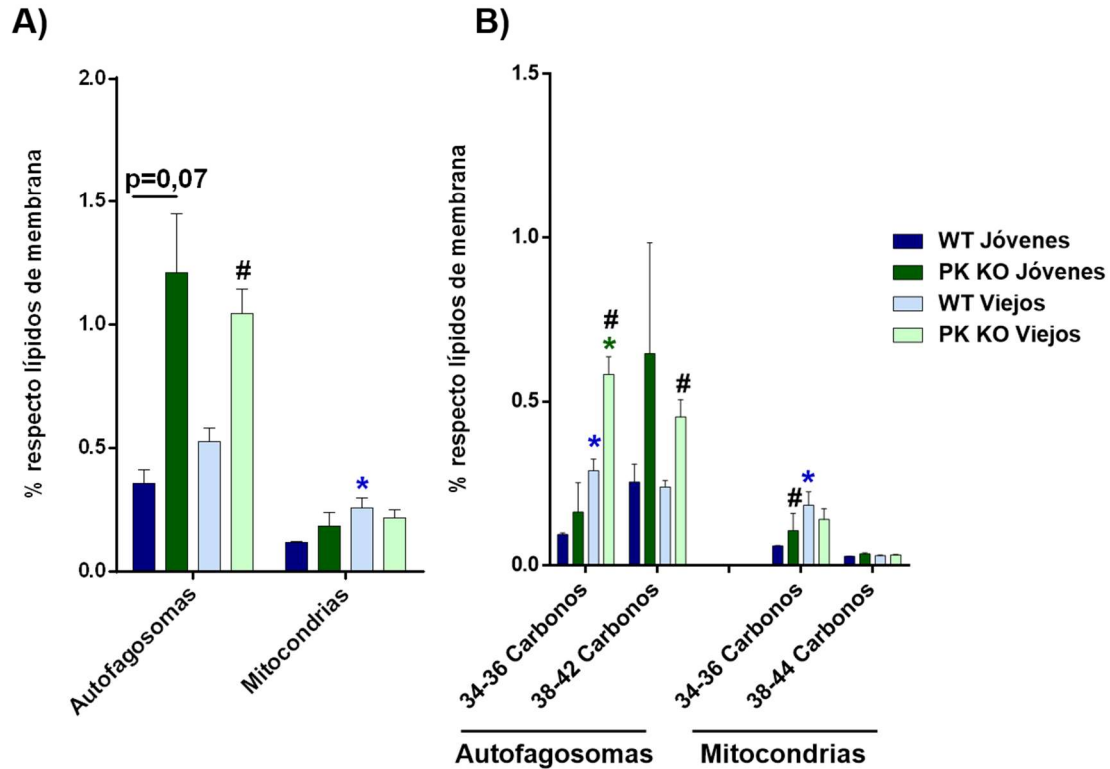
En las membranas de autofagosomas la eliminación de Parkin incrementó los niveles de Cer en animales jóvenes (en las formas con ácidos grasos largos) y viejos (en formas con ácidos grasos cortos y largos) (figura 49; panel B), mientras que en las membranas de las mitocondrias el envejecimiento aumentó las Cer con ácidos grasos cortos en animales WT (figura 49; paneles A y B). Estos resultados indicaron que la regulación de Cer era dependiente de orgánulo subcelular y de la longitud del ácido graso.

El análisis de la composición lipídica de las membranas de mitocondrias de hígado permitió detectar cambios promovidos por la ausencia de Parkin y el envejecimiento, así como comparar las alteraciones obtenidas en autofagosomas y mitocondrias. En la membrana de las mitocondrias se detectaron modificaciones en PE, lisofosfolípidos y esfingolípidos (Cer e hidroxilación de Cer y HexCer). Los cambios en PE podrían deberse a alteraciones en la expresión de PSD y PEMT. La comparación de las modificaciones de lisofosfolípidos y Cer en las membranas de autofagosomas y mitocondrias demostró que

## Resultados

existía una regulación dependiente de orgánulo de la composición lipídica en respuesta a la eliminación de Parkin y al envejecimiento.

### Cer en autofagosomas y mitocondrias

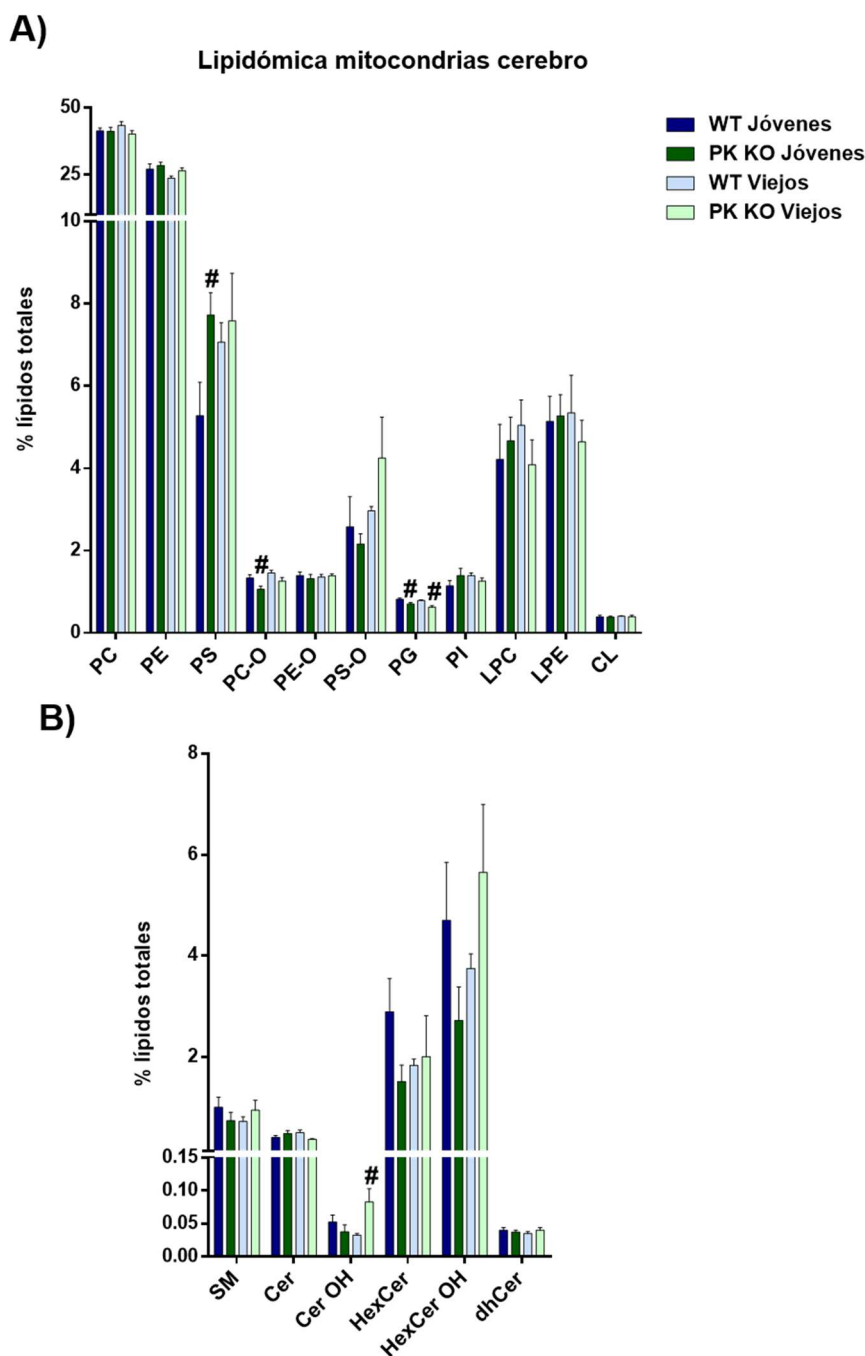


**Figura 49: Comparación de los cambios en Cer en autofagosomas y mitocondrias de hígados de ratones WT y PK KO.** A) Porcentajes de Cer en autofagosomas y mitocondrias de hígado respecto al total de lípidos de membrana. B) Porcentajes de Cer con ácidos grasos cortos (34-36 carbonos) o largos (38-44 carbonos) en autofagosomas y mitocondrias de hígado respecto al total de lípidos de membrana. \* (azul)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en WT. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=3$  para los autofagosomas y  $n=5$  para las mitocondrias. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.

## 5.6. Lipidómica de mitocondrias de cerebro WT y PK KO tras activación de autofagia. Efecto de la ausencia de Parkin y del envejecimiento

La delección de Parkin disminuyó la proporción de PG tanto en mitocondrias aisladas de animales jóvenes como viejos (figura 50; panel A). El análisis de las especies de PG (datos no mostrados) puso de manifiesto que este efecto se produjo en todas las especies indicando que Parkin estaba implicada en la síntesis del conjunto de PG y no en la remodelación de esta clase lipídica. La eliminación de Parkin y el envejecimiento alteraron los porcentajes de otras clases lipídicas (figura 50 y tabla 9).

## Resultados



**Figura 50: Caracterización lipidómica de mitocondrias aisladas a partir de cerebros de ratones WT y PK KO.** Se aislaron las mitocondrias a partir de animales jóvenes y viejos tras 6 horas de ayuno. **A)** Porcentajes de las distintas clases de fosfolípidos detectadas respecto al total de lípidos. **B)** Porcentajes de las distintas clases de esfingolípidos detectadas respecto al total de lípidos. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin. Análisis estadístico mediante t de Student y posterior análisis Holm-Sidak.  $n=4$  para cada condición. PC: Fosfatidilcolina. PE: Fosfatidiletanolamina. PS: Fosfatidilserina. PC-O: Éter lípidos con colina. PE-O: Éter lípidos con etanolamina. PS-O: Éter lípidos con serina. PG: Fosfatidilglicerol. PI: Fosfatidilinositol. LPC: Lisofosfatidilcolina. LPE: Lisofosfatidiletanolamina. CL: Cardiolipina. SM: Esfingomielina. Cer:



## Resultados

Ceramida. Cer OH: Ceramida hidroxilada. HexCer: Hexosilceramida. HexCer OH: Hexosilceramida hidroxilada. dhCer: Dihidroceramida.

Cambios con ausencia de Parkin		Cambios con envejecimiento		
	Jóvenes	Viejos	WT	PK KO
PS	↑	-	-	-
PG	↓	↓	-	-
PC-O	↓	-	-	-
Cer OH	-	↑	-	-

**Tabla 9: Cambios de distintas clases lipídicas en mitocondrias de cerebros de ratones WT y PK KO provocados por la activación de autofagia y el envejecimiento.**

### 5.6.1. Cambios en PS y PE

Las cantidades de PS se vieron afectados por la eliminación de Parkin en animales jóvenes (figura 50; panel A). Se analizaron las alteraciones en especies lipídicas de PE y de PS (aunque no se produjeron cambios a nivel de clase en los niveles de PE) para determinar si existían distintos patrones de cambio en función del grado de insaturación de los ácidos grasos. Además, se analizaron los niveles de la enzima PSD en mitocondrias (no se analizaron los niveles de PEMT ya que no se expresa en cerebro) (Vance 2014).

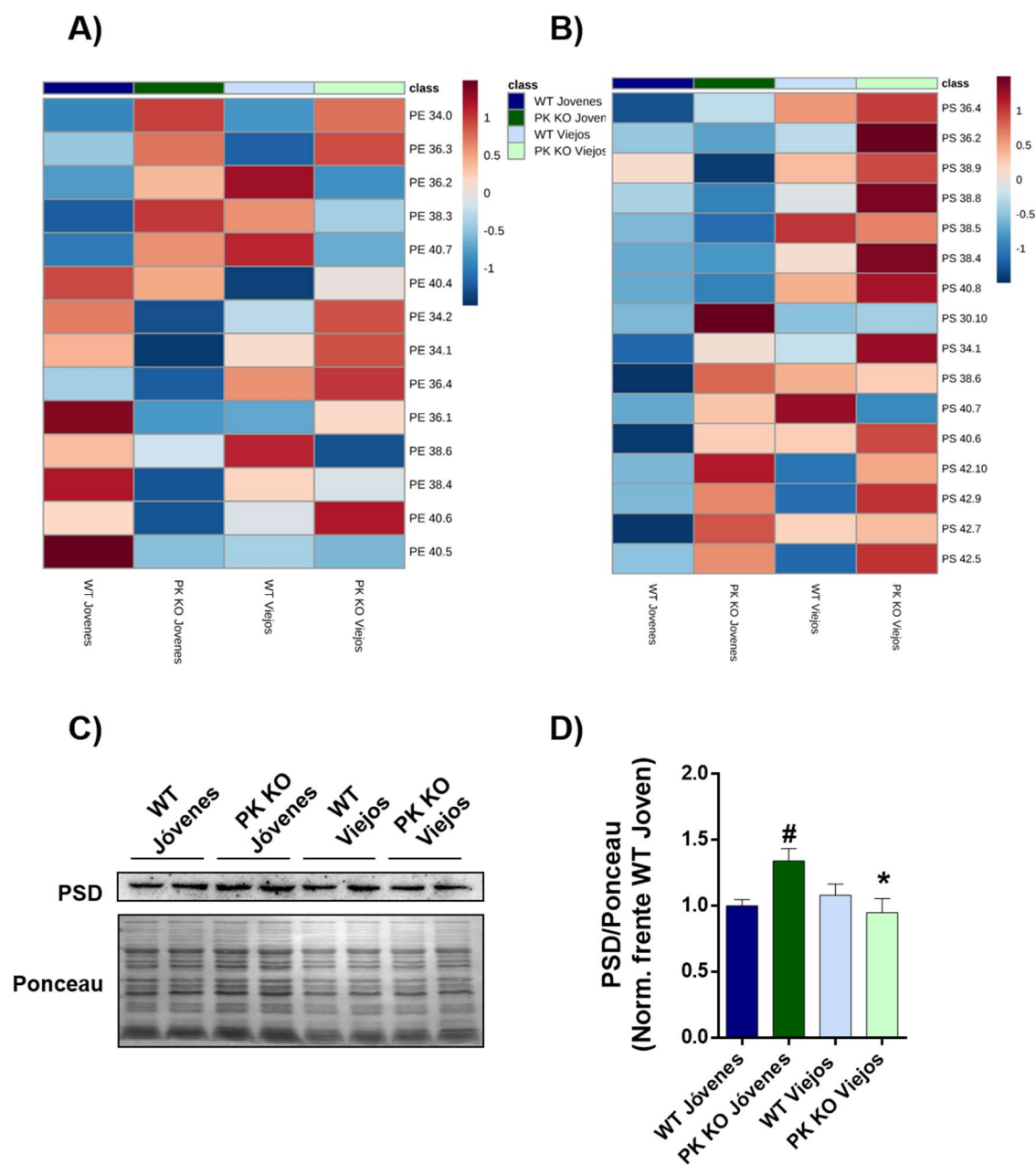
La carencia de Parkin incrementó el porcentaje de especies de PE con PUFAs (40:7; 40:4), mientras que el envejecimiento lo disminuyó en animales PK KO (figura 51; panel A). En cambio, la supresión de Parkin en animales jóvenes disminuyó la abundancia de especies de PS con PUFAs, y el envejecimiento en estos animales provocó una disminución de estas especies (figura 51; panel B).

Las mitocondrias de animales PK KO presentaban valores más altos de PSD, y el envejecimiento los disminuyó (figura 51; panel C). Las alteraciones en PSD en las mitocondrias de cerebro se correlacionaban con las observadas en las especies de PE y PS con PUFAs. La carencia de la enzima PEMT en el cerebro impidió que la PE producida en las mitocondrias se transformase en PC y, por lo tanto, los cambios en PSD tuvieron gran impacto sobre los valores de PE en las membranas de estos orgánulos.

### 5.6.2. Modificación del ratio éter lípido/fosfolípido

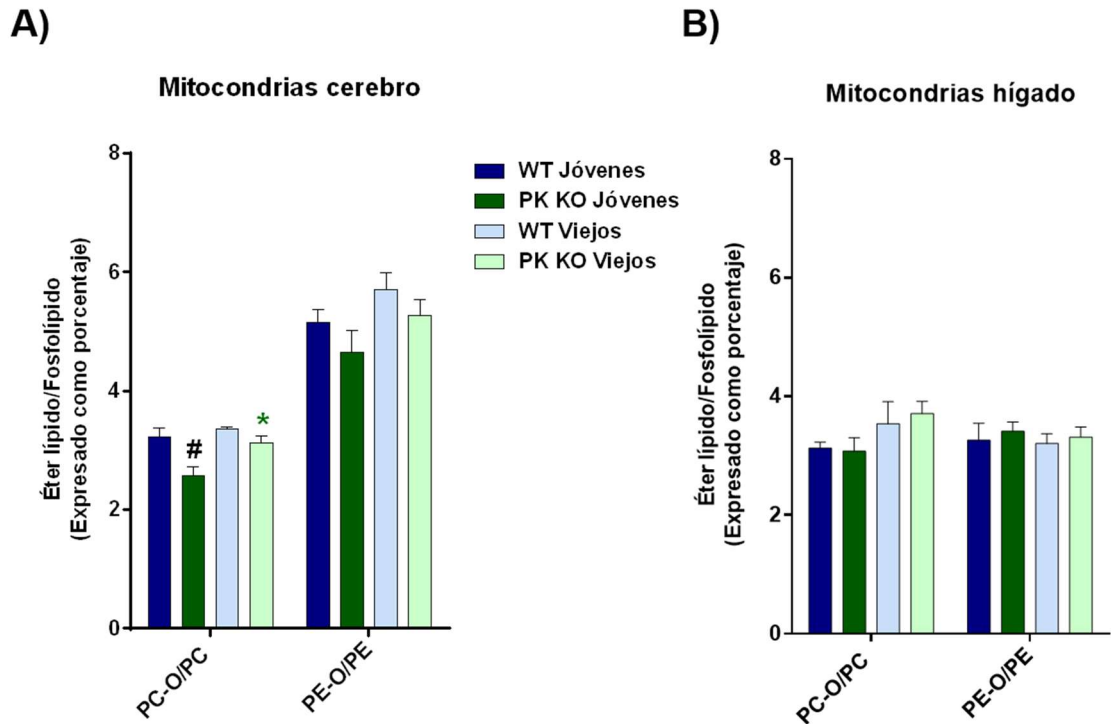
La eliminación de Parkin y el envejecimiento alteraron el ratio PC-O/PC (figura 52; panel A). Las mitocondrias de animales PK KO jóvenes presentaban menor ratio que las de animales WT. Por otro lado, el envejecimiento incrementó PC-O/PC solo en los animales PK KO (figura 52; panel A). Se observaron los mismos cambios en el ratio PE-O/PE aunque en este caso las diferencias no eran estadísticamente significativas (figura 52; panel A).

## Resultados



**Figura 51: Especies de PE y PS y niveles de PSD de mitocondrias de cerebros de ratones WT y PK KO. Cambios con la supresión de Parkin y el envejecimiento.** **A)** Análisis mediante software Metaboanalyst de las especies mayoritarias de PE. **B)** Análisis mediante software Metaboanalyst de las especies mayoritarias de PS. **C)** Western-blot de mitocondrias aisladas a partir de cerebros WT y PK KO incubadas con anticuerpo frente a PSD. **D)** Cuantificación de los niveles de PSD en mitocondrias de cerebro. En los paneles **A)** y **B)** Se indican la suma del número de carbonos e insaturaciones de las cadenas laterales. \*  $p < 0,05$  debido al envejecimiento. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=4$  para los análisis lipidómicos y  $n=6$  para western-blot. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Holm-Sidak.

## Resultados



**Figura 52: Ratios éter lípido/fosfolípido en mitocondrias de cerebros e hígados. Modificaciones con la eliminación de Parkin y el envejecimiento. A)** Ratio éter lípido/fosfolípido para PC-O y PE-O en mitocondrias de cerebro. **B)** Ratio éter lípido/fosfolípido para PC-O y PE-O en mitocondrias de hígado. \* (verde)  $p < 0,05$  debido al envejecimiento en PK KO. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=4$  para mitocondrias de cerebro y  $n=5$  para mitocondrias de hígado. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Holm-Sidak.

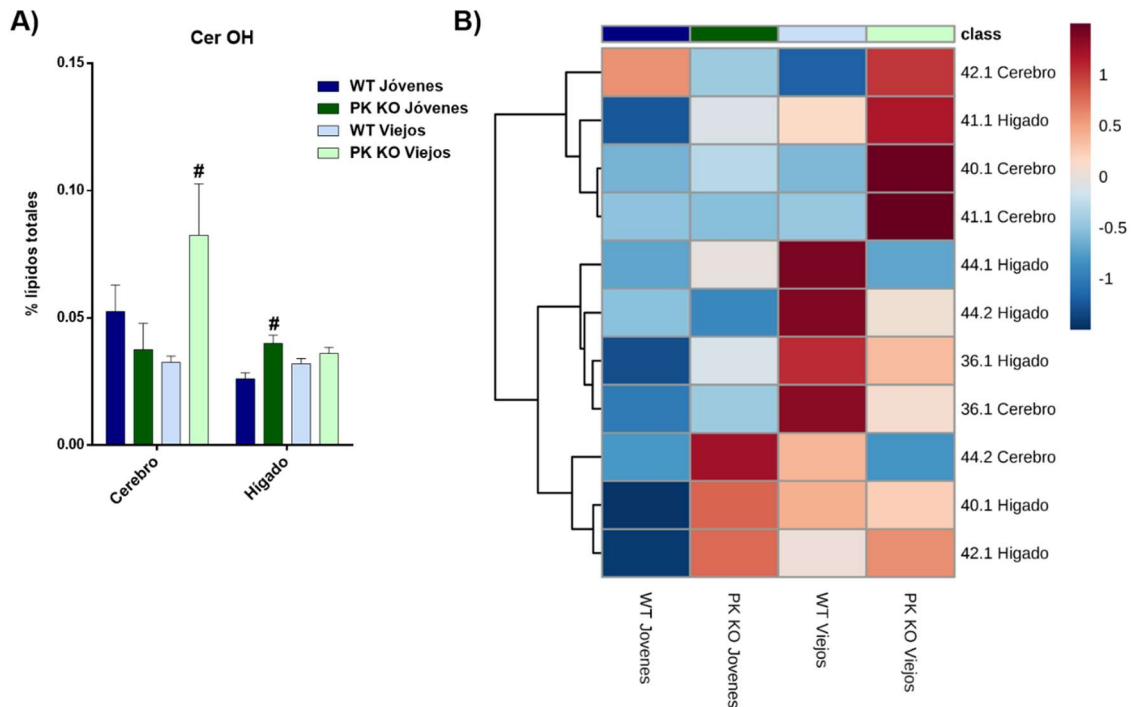
Las alteraciones en el cerebro contrastaron con la ausencia de cambios observada en el hígado (figura 52; panel B). Esto pudo deberse a varios factores: mayor expresión de Parkin y mayores niveles de estas clases lipídica en el cerebro, o mayor regulación de los niveles de esta clase lipídica en las mitocondrias de hígado. La disminución de PC-O en las mitocondrias de cerebro inducida por la supresión de Parkin podría estar asociada a los defectos mitocondriales detectados en estos animales, sobre todo teniendo en cuenta la función antioxidante atribuida a esta clase lipídica.

### 5.6.3. Alteraciones en la hidroxilación de Cer

En el cerebro la eliminación de Parkin incrementó el porcentaje de Cer OH (Cer hidroxiladas) en animales viejos, mientras que en el hígado este aumento se produjo en los animales jóvenes (figura 53; panel A).

Los incrementos de los niveles de Cer OH debidos a la ausencia de Parkin se produjeron en especies distintas en mitocondrias de cerebro e hígado. Mientras que en mitocondrias de cerebro las alteraciones se produjeron en las especies 40:1; 41:1 y 42:1, los cambios en mitocondrias de hígado solo se detectaron en las especies 40:1 y 42:1 (figura 53; panel B).

## Resultados



**Figura 53: Especies de Cer OH de mitocondrias de cerebros e hígados de ratones WT y PK KO. Cambios con la delección de Parkin y el envejecimiento. A)** Porcentaje de Cer OH en mitocondrias de cerebros e hígados respecto al total de lípidos de membrana. **B)** Modificaciones en las especies de Cer OH en cerebro e hígado. Se indican la suma del número de carbonos e insaturaciones de los ácidos grasos. #  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.  $n=4$  para mitocondrias de cerebro y  $n=5$  para mitocondrias de hígados. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Holm-Sidak.

Estos resultados demostraron que aunque la eliminación de Parkin incrementaba los niveles de Cer OH en las membranas de mitocondrias aisladas tanto de cerebro como de hígado, existían diferencias en los procesos que mediaban la hidroxilación de esta clase lipídica, ya que se producía a distintas edades y en diferentes especies lipídicas.

Los cuatro análisis lipidómicos llevados a cabo (autofagosomas de hígados WT, autofagosomas y mitocondrias de hígados y mitocondrias de cerebro WT y PK KO) permitieron identificar modificaciones en distintas clases de fosfolípidos y esfingolípidos (PE, éter lípidos, lisofosfolípidos y Cer OH) inducidos por el ayuno, el envejecimiento o la supresión de Parkin; indicando la importancia de la modulación de los niveles de estas clases lipídicas para los procesos de modificación de membranas de orgánulos subcelulares.

En el caso de PE y PS en membranas de autofagosomas y mitocondrias se estudiaron las enzimas implicadas en la modificación de fosfolípidos, PSD y PEMT, con el fin de detectar alteraciones provocadas por la activación de autofagia, la delección de Parkin o el envejecimiento. Los resultados demostraron que las alteraciones en PE y PS eran debidas, al menos en parte, a la modulación de los niveles de estas dos enzimas.

Además, se observó que existían cambios distintos en las mismas clases lipídicas en diferentes orgánulos subcelulares, mostrando una regulación de la composición

## Resultados

lipídica a nivel de orgánulo subcelular. Estas alteraciones en autofagosomas y mitocondrias podrían deberse a modificaciones en los mecanismos de transferencia de lípidos entre membranas de orgánulos subcelulares.

Se profundizó en el estudio de las alteraciones de especies lipídicas dentro de estas clases con el fin de hallar patrones de cambio en función del grado de insaturación o la longitud de sus ácidos grasos. Se demostró que los cambios en lisofosfolípidos de autofagosomas y mitocondrias de hígado eran distintos en función del grado de insaturación del ácido graso. Por otro lado, los cambios que se observaron en los niveles de Cer en las membranas de autofagosomas y mitocondrias podían clasificarse en función de la longitud del ácido graso.

En último lugar, estos análisis lipidómicos permitieron caracterizar cambios en las distintas clases de éter lípidos. Las alteraciones se observaron en las dos clases principales, PC-O y PE-O, y eran distintos en función del orgánulo subcelular analizado. Este grupo de lípidos presenta características que podrían ser importantes en los procesos de autofagia (etanolamina como grupo polar, elevados niveles de PUFAs o implicación en procesos de fusión/fisión de membranas) y en la funcionalidad mitocondrial (función antioxidante) y, por ello, en los siguientes apartados del trabajo se estudió la posible modulación de la autofagia y la actividad mitocondrial por la estimulación selectiva de la síntesis de este grupo de lípidos.

Todos estos resultados dan una idea de la plasticidad que existe a nivel de la composición lipídica de la membrana de distintos orgánulos subcelulares en respuesta a la activación de autofagia, a la eliminación de Parkin y al envejecimiento. Los cambios detectados podrían tener implicaciones sobre la autofagia, la funcionalidad mitocondrial y la transferencia de lípidos entre distintos orgánulos subcelulares y podrían explicar algunas de las alteraciones de estos procesos asociados al envejecimiento y a la enfermedad de Parkinson.

### **5.7. Efecto de la ausencia de Parkin y de la activación de autofagia en astrocitos**

A partir de estos resultados, el trabajo se centró en un análisis de la composición lipídica, la autofagia y la morfología y funcionalidad mitocondrial en astrocitos en cultivo, y los cambios causados por el incremento de los niveles de éter lípidos mediante la adición de dos lípidos, HG y eLpPC. El primero es un precursor general de la síntesis de éter lípidos (aunque posteriormente puede movilizarse a otras clases lipídicas) y el segundo es un éter lípido exógeno precursor de la síntesis de plasmanil-PC.

Este trabajo se llevó a cabo en astrocitos porque tienen una elevada tasa de funcionalidad mitocondrial, actúan donando nutrientes a las neuronas sobre todo en situaciones de estrés nutricional (al igual que hace el hígado) (Guzman and Blazquez 2001) y por la existencia de numerosos trabajos previos con este tipo celular en el ratón PK KO (Solano, Casarejos et al. 2008, Casarejos, Solano et al. 2009) en los que se han establecido las condiciones de cultivo y el estado basal de la autofagia.

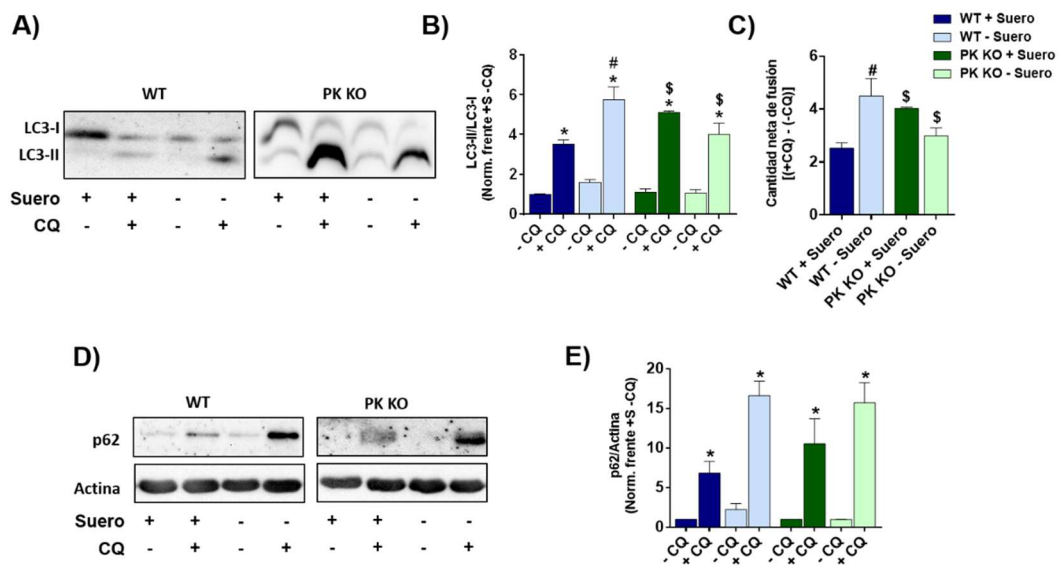
## Resultados

En la primera parte del trabajo in vitro, se caracterizaron la tasa de actividad autofágica y la morfología y funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO en respuesta a la retirada de suero y a la despolarización mitocondrial inducida por el CCCP. A continuación, se estudiaron los efectos de la adición de HG sobre la composición lipídica, la autofagia, la mitofagia y la funcionalidad mitocondrial. Por último, se analizaron los efectos del tratamiento con eLpPC sobre todos estos procesos celulares.

### 5.7.1. Actividad autofágica

La caracterización de la autofagia y la mitofagia se llevó a cabo mediante la cuantificación del ratio entre las intensidades de la señal de LC3-II y LC3-I, la cuantificación de la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (resta de las condiciones con y sin CQ) y la intensidad de señal de p62 en experimentos de western-blot, y la cuantificación del número y área de partículas positivas para LC3, p62 y LAMP1 en experimentos de inmunofluorescencia.

En primer lugar, se analizó el estado de la maquinaria autofágica en astrocitos WT y PK KO y los cambios producidos por la activación de autofagia y el bloqueo de la degradación lisosomal. El empleo de CQ, u otros compuestos que bloqueen el flujo de los autofagosomas o la degradación en el interior de los lisosomas, es necesario para estudiar los procesos autofágicos determinando las tasas de producción y degradación de autofagosomas.



**Figura 54: Niveles de LC3 y p62 en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la activación de autofagia y el bloqueo de la degradación lisosomal.** A) Western-blot de astrocitos WT y PK KO incubados con anticuerpo frente a LC3. B) Cuantificación del ratio de intensidades LC3-II/LC3-I. C) Cuantificación de la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (Resta del ratio LC3-II/LC3-I en presencia de CQ menos en ausencia de CQ). D) Western-blot de astrocitos WT y PK KO incubados con anticuerpos frente a p62 y actina. E) Cuantificación de la intensidad de p62 frente a la intensidad de actina. En los paneles B y D se ha normalizado frente al valor de las condiciones +S -CQ. n=6 para cada condición. Análisis estadístico mediante

## Resultados

ANOVA de una vía y posterior análisis Tukey. \*  $p < 0,05$  inducido por CQ. #  $p < 0,05$  inducido por la retirada de suero. \$  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.

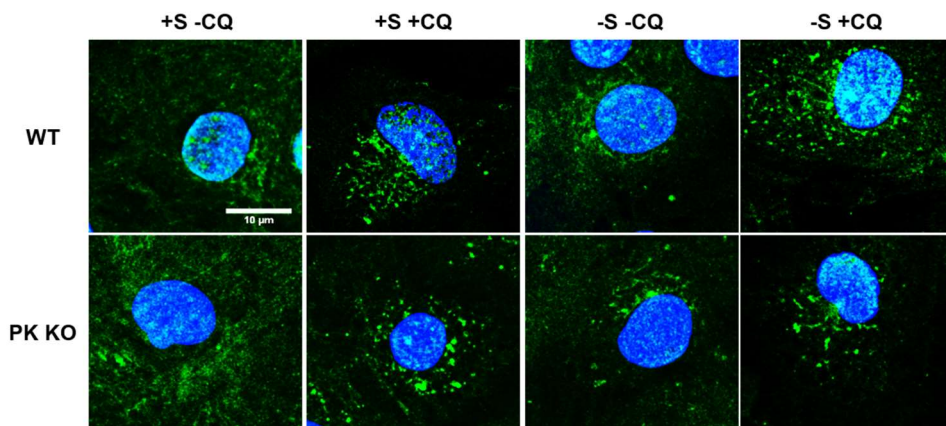
En condiciones basales el bloqueo de la degradación lisosomal provocó una mayor acumulación de autofagosomas (mayor ratio LC3-II/LC3-I) en las células PK KO (figura 54; paneles A y B). Sin embargo, la activación de la autofagia aumentó el ratio LC3-II/LC3-I tras el bloqueo de la degradación lisosomal solo en células WT (figura 54; paneles A y B). La mayor tasa autofágica en las células PK KO en condiciones basales y la respuesta de las células WT a la retirada de suero también se observó al cuantificar la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (figura 54; panel C).

La adición de CQ en condiciones basales incrementó los niveles de p62 en los dos tipos de células (figura 54; paneles D y E). Al igual que ocurría con LC3-II, el ayuno provocó un mayor aumento de los niveles de p62 en células WT que en PK KO tras el bloqueo de la degradación lisosomal (figura 54; paneles D y E).

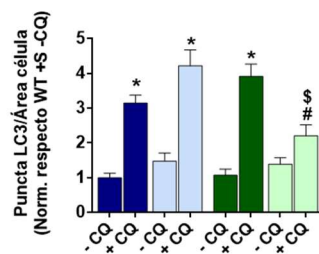
Estos resultados demostraron que aunque las células PK KO tenían una mayor tasa de actividad autofágica en condiciones basales, no respondían a la retirada de suero mientras que las células WT respondían a este estímulo activando la autofagia.

A continuación, se caracterizó la actividad autofágica en astrocitos WT y PK KO mediante la cuantificación del número y del área media de partículas positivas para LC3, p62 y LAMP1 en experimentos de inmunofluorescencia.

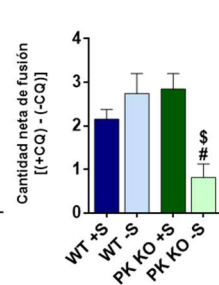
A)



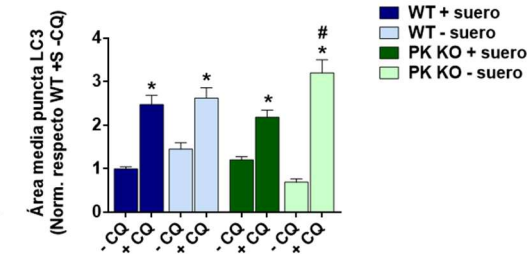
B)



C)



D)





## Resultados

**Figura 55: Inmunomarcaje para LC3 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la retirada de suero. A)** Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. **B)** Cuantificación del número de “puncta” positivos para LC3 (autofagosomas). **C)** Cuantificación de la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (Resta del número de puncta positivos para LC3 en presencia de CQ menos en ausencia de CQ). **D)** Área media de las partículas positivas para LC3. n=20-40 células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \*  $p < 0,05$  debido a la cloroquina. #  $p < 0,05$  debido a la retirada de suero. \$  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin.

En condiciones basales las células PK KO presentaban un mayor número de autofagosomas que las células WT (condiciones con CQ) (figura 55; paneles A y B). Sin embargo, la retirada de suero incrementó el número de autofagosomas solo en células WT (figura 55; panel B). Estos efectos también se observaron al analizar la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (figura 55; panel C). En cuanto al área de los autofagosomas, la retirada de suero aumentó este parámetro en astrocitos PK KO (figura 55; panel D).

El mayor número de autofagosomas presentes en astrocitos PK KO ya ha sido descrito en otros trabajos (Casarejos, Solano et al. 2009), y se debe a mecanismos de compensación presentes en estas células encaminados a paliar los déficits en la ubiquitinación de proteínas mediada por Parkin y su posterior degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma.

Los astrocitos WT respondían al ayuno mediante el incremento de la tasa de actividad autofágica, mientras que los astrocitos PK KO no respondían a este estímulo. Además, el incremento del área de los autofagosomas, unido a la disminución del número de estos orgánulos, en astrocitos PK KO tras la retirada de suero apuntaba a defectos en la fusión entre autofagosomas y lisosomas en estas condiciones.

Los astrocitos PK KO presentaban mayor acumulación de partículas positivas para p62 cuando se bloqueaba la degradación lisosomal en presencia de suero ( $p=0,07$ ; figura 56; paneles A-B). Sin embargo, el ayuno incrementó el número de estas partículas solo en astrocitos WT (figura 56; panel B). Por otro lado, se detectaron aumentos del área de las partículas positivas para p62 al bloquear la degradación lisosomal en astrocitos WT y PK KO en condiciones basales y en células WT tras la retirada de suero (figura 56; panel C).

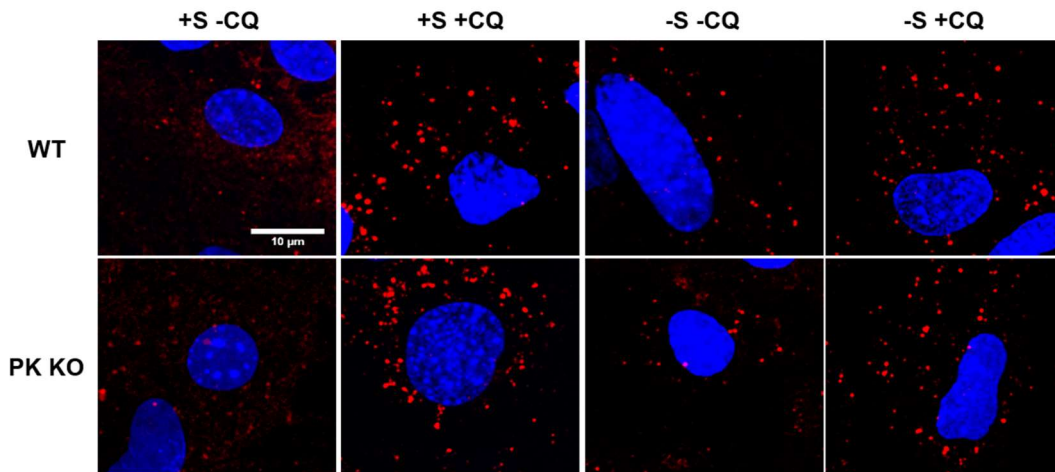
Estos resultados confirmaron que los astrocitos PK KO presentaban mayores tasas basales de actividad autofágica pero que la retirada de suero solo incrementaba estas tasas en astrocitos WT.

El número de lisosomas no varió ni en ausencia de Parkin ni tras la retirada de suero (figura 57; panel B). En cuanto al área de estos orgánulos, se observaron incrementos en astrocitos WT y PK KO tras la adición de CQ en condiciones basales (figura 57; panel C). Estos resultados demostraron que los incrementos de actividad autofágica observados en las células PK KO en condiciones basales y en células WT tras la retirada de suero eran fisiológicos, ya que no se observó un aumento anómalo del área de los lisosomas en ninguna de estas condiciones.

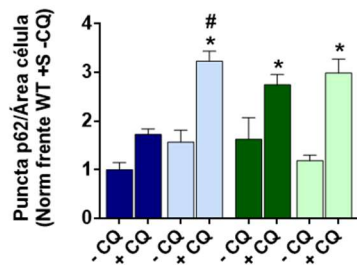


## Resultados

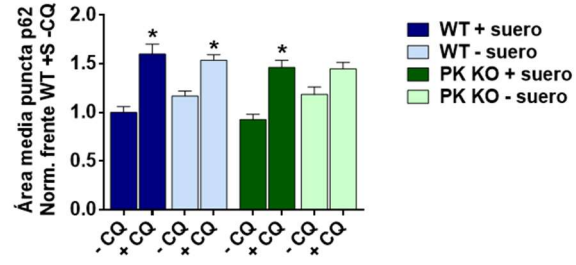
A)



B)



C)



**Figura 56: Inmunomarcado para p62 en astrocitos WT y PK KO. Efecto del ayuno.** A) Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. B) Cuantificación del número de “puncta” positivos para p62. C) Área media de las partículas positivas para p62. n=20-40 células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la cloroquina. # p<0,05 debido a la retirada de suero.

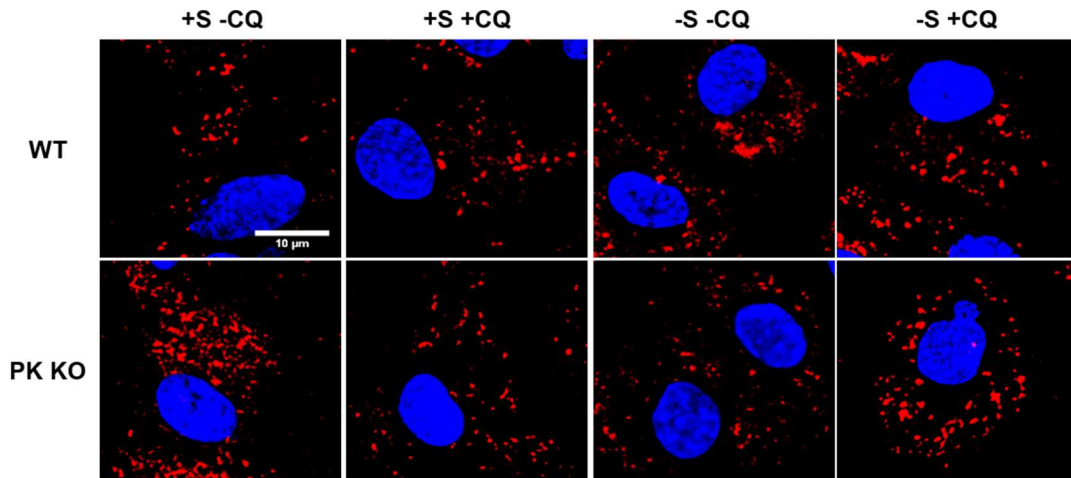
### 5.7.2. Morfología mitocondrial

Tras la caracterización del efecto de la retirada de suero sobre la actividad autofágica, se estudió el efecto del mismo estrés nutricional sobre la morfología (uso de la sonda fluorescente Mitotracker) y funcionalidad (analizador de flujo metabólico Seahorse XFp) mitocondrial de astrocitos WT y PK KO. La morfología y la funcionalidad de las mitocondrias están altamente relacionadas, ya que, para que este orgánulo lleve a cabo sus funciones energéticas de forma apropiada y pueda responder a distintos estímulos adaptando su tasa de producción de energía, es necesario que se establezcan procesos de fusión/fisión y de síntesis/degradación de mitocondrias (Rambold, Cohen et al. 2015). Está descrito que alteraciones en estos procesos inducen fallos a nivel de funcionalidad mitocondrial y contribuyen a la patología en diversas enfermedades, entre las que se encuentra la enfermedad de Parkinson (Bertholet, Delerue et al. 2016). Además, la proteína Parkin está implicada en la degradación selectiva de mitocondrias dañadas

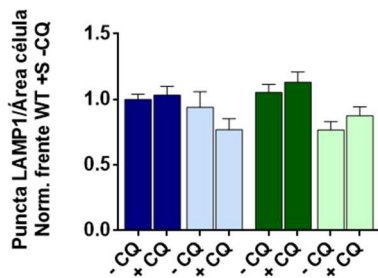
## Resultados

mediante mitofagia, y su supresión tiene efectos sobre los procesos de fusión/fisión y síntesis/degradación de mitocondrias.

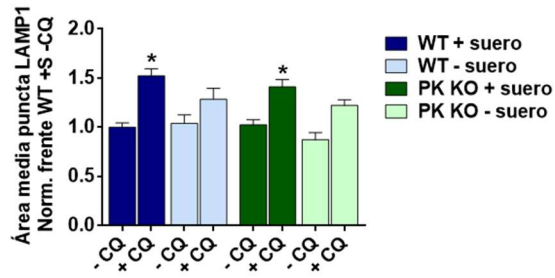
**A)**



**B)**



**C)**



**Figura 57: Inmunomarcaje para LAMP1 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la ausencia de suero. A)** Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. **B)** Cuantificación del número de “puncta” positivos para LAMP1 (lisosomas). **C)** Área media de las partículas positivas para LAMP1. n=20-40 células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la cloroquina.

En primer lugar, se estudió la morfología mitocondrial en condiciones basales y en condiciones de ayuno en ausencia o presencia de CQ. A raíz de las imágenes de inmunofluorescencia de células WT y PK KO marcadas con Mitotracker, se cuantificaron diversos parámetros relativos a la morfología mitocondrial (área media, perímetro medio, relación área/perímetro, número de mitocondrias/área celular y circularidad).

El área media de las mitocondrias disminuyó en astrocitos WT tras el bloqueo de la degradación lisosomal en condiciones de ayuno (figura 58; paneles A y B). Además, ambos tipos de células presentaban mitocondrias más pequeñas tras la incubación con CQ en ausencia de suero respecto a la adición de CQ en condiciones basales (figura 58; paneles A y B). Los cambios en el perímetro mitocondrial se limitaron a una disminución en astrocitos WT y PK KO en condiciones de retirada de suero y presencia de CQ (figura 58; paneles A y C).

## Resultados

El análisis del ratio área/perímetro, indicador de la interconectividad de las mitocondrias, no reveló ningún cambio promovido por la activación de autofagia, la incubación con CQ o la eliminación de Parkin (figura 58; paneles A y D).

Por otro lado, el ayuno incrementó la circularidad en astrocitos WT (figura 58; paneles A y E). En condiciones de activación de autofagia, la adición de CQ aumentó la circularidad de las mitocondrias solo en células PK KO (figura 58; paneles A y E). Por último, el número de mitocondrias era mayor en astrocitos WT tras la retirada de suero, mientras que en las células PK KO no se produjo ningún cambio (figura 58; paneles A y F).

Los resultados demostraron que la eliminación de Parkin, la activación de autofagia y el bloqueo de la degradación lisosomal afectaban a la morfología y al número de mitocondrias. Los cambios en los distintos parámetros morfológicos, área, perímetro y circularidad, fueron similares en los dos tipos de células indicando que la delección de Parkin no afectaba a la morfología de mitocondrias existentes en condiciones de ayuno.

Sin embargo, la eliminación de Parkin sí afectó al número de mitocondrias tras la activación de autofagia. En estas condiciones, las células WT respondieron incrementando el número de mitocondrias, posiblemente activando los procesos de fisión y síntesis mitocondrial. En cambio, en las células PK KO no se produjo este efecto, corroborando la implicación de la proteína Parkin en los procesos encaminados a aumentar el número de mitocondrias en situaciones de estrés nutricional.

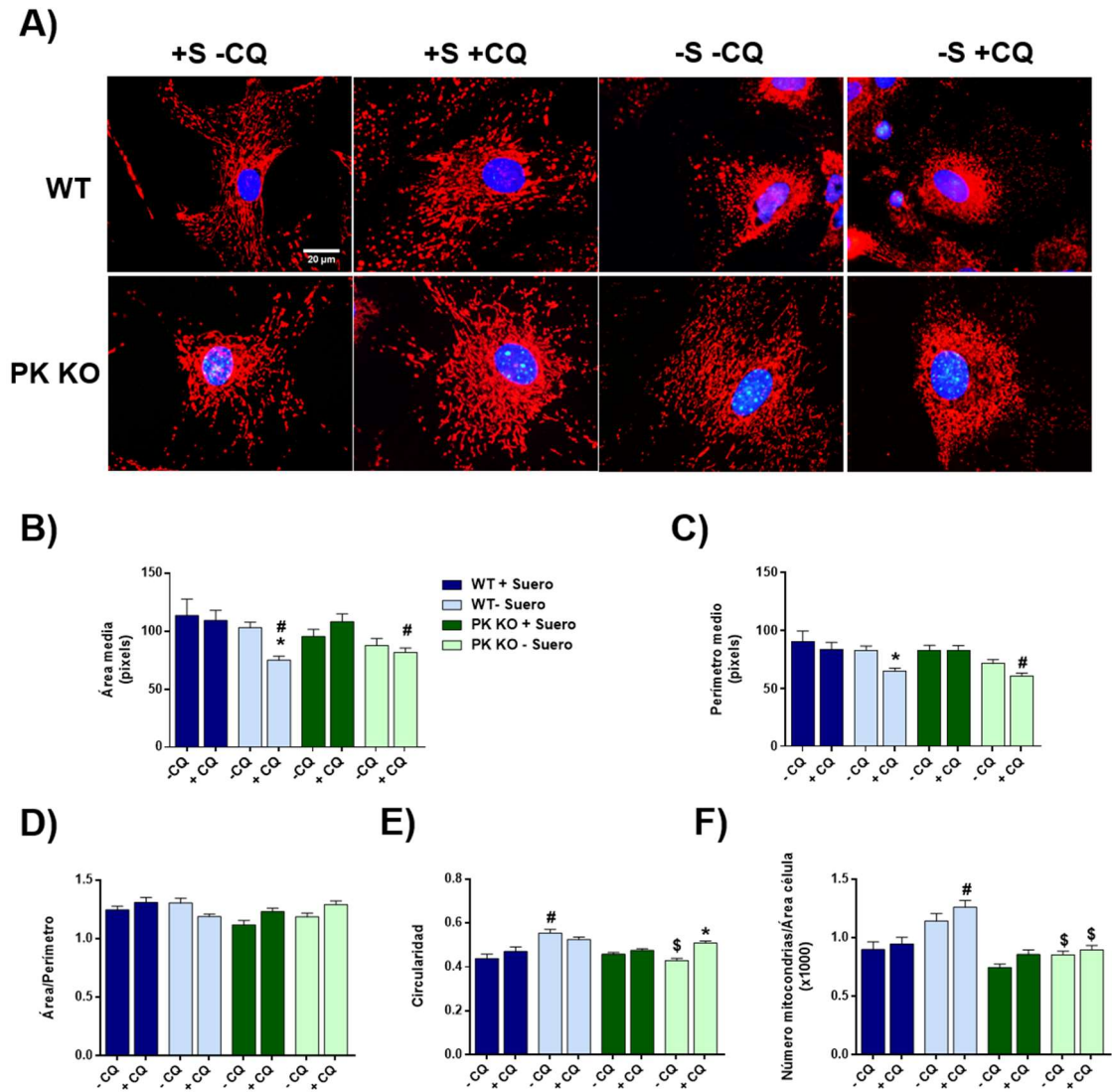
### 5.7.3. Funcionalidad mitocondrial

Una vez caracterizados los cambios en la morfología mitocondrial en las distintas condiciones, se quiso estudiar si éstos iban acompañados de alteraciones en la funcionalidad mitocondrial. A raíz del OCR medido por el analizador Seahorse XFp, se analizaron varios parámetros relativos a la actividad respiratoria mitocondrial (explicación del efecto de las drogas del Mito Stress Kit y del cálculo de los distintos parámetros en las figuras 23 y 24 del apartado de materiales y métodos).

La activación de autofagia disminuyó el OCR tras la adición de FCCP en astrocitos PK KO (figura 59; panel A).

En cuanto al análisis de los diversos parámetros relativos a la funcionalidad mitocondrial, la retirada de suero no afectó a las células WT, mientras que en las células PK KO este estrés nutricional disminuyó la respiración mitocondrial máxima y la capacidad respiratoria de reserva (figura 59; paneles D y E; diferencias no estadísticamente significativas). Estos efectos pudieron estar asociados al menor número de mitocondrias observadas en los astrocitos PK KO en estas condiciones (figura 58; paneles A y F) y, por lo tanto, ahondarían en la implicación de Parkin en los procesos encaminados a adecuar la actividad mitocondrial a situaciones de estrés.

## Resultados



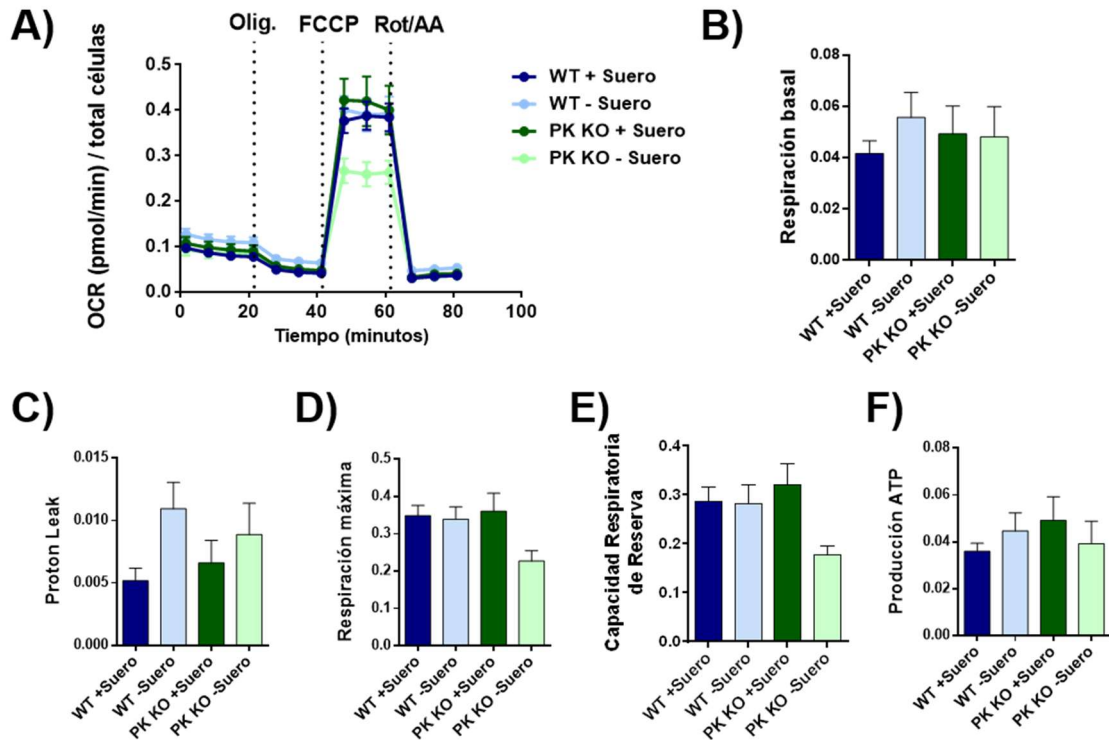
**Figura 58: Morfología mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Efectos de la activación de autofagia y del bloqueo de la degradación lisosomal. A)** Imágenes representativas de las condiciones ensayadas. **B)** Cuantificación del área media. **C)** Cuantificación del perímetro medio. **D)** Ratio entre el área y el perímetro (interconectividad). **E)** Cuantificación de la circularidad. **F)** Número de mitocondrias por área celular. n=30 células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la adición de CQ. # p<0,05 debido a la retirada de suero. \$ p<0,05 debido a la ausencia de Parkin. S: Suero. CQ: Cloroquina.

### 5.8. Efectos de la inducción de daño mitocondrial en astrocitos WT y PK KO

Una vez caracterizado el estado de la maquinaria autofágica y la morfología y funcionalidad mitocondrial en respuesta a la retirada de suero, se llevaron a cabo los mismos experimentos pero tras la inducción de daño mitocondrial mediante incubación

## Resultados

con CCCP. Este compuesto despolarizante promueve mitofagia dependiente de Parkin (Narendra, Tanaka et al. 2008).



**Figura 59: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la retirada de suero y la supresión de Parkin.** A) Cinéticas de experimentos MitoStress Kit de Seahorse XFp en astrocitos WT y PK KO en presencia o ausencia de suero durante seis horas. Se indican los tiempos a los que se inyectaron cada uno de los tres compuestos del kit. Se representan las tasas de consumo de oxígeno divididas entre el número total de células por pocillo. B) Tasa de respiración basal. C) Tasa de “proton leak”. D) Tasa de respiración máxima. E) Tasa de capacidad respiratoria de reserva. F) Tasa de producción de ATP. n=9 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey.

### 5.8.1. Actividad autofágica

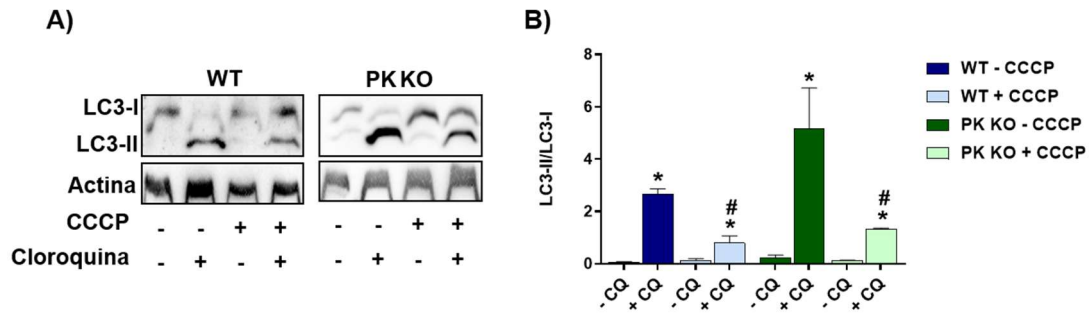
El análisis del estado de la autofagia tras la exposición a CCCP se llevó a cabo mediante experimentos de western-blot e inmunofluorescencia.

La incubación con CCCP disminuyó el ratio LC3-II/LC3-I tras el bloqueo de la degradación lisosomal tanto en astrocitos WT como PK KO (figura 60; paneles A y B). Por lo tanto, el CCCP no activó la maquinaria autofágica y la ausencia de Parkin no provocó ningún cambio en el ratio LC3-II/LC3-I, aunque este hecho no implicaba que no estuviese afectada la mitofagia mediada por Parkin en presencia de CCCP (figura 60; paneles A y B).

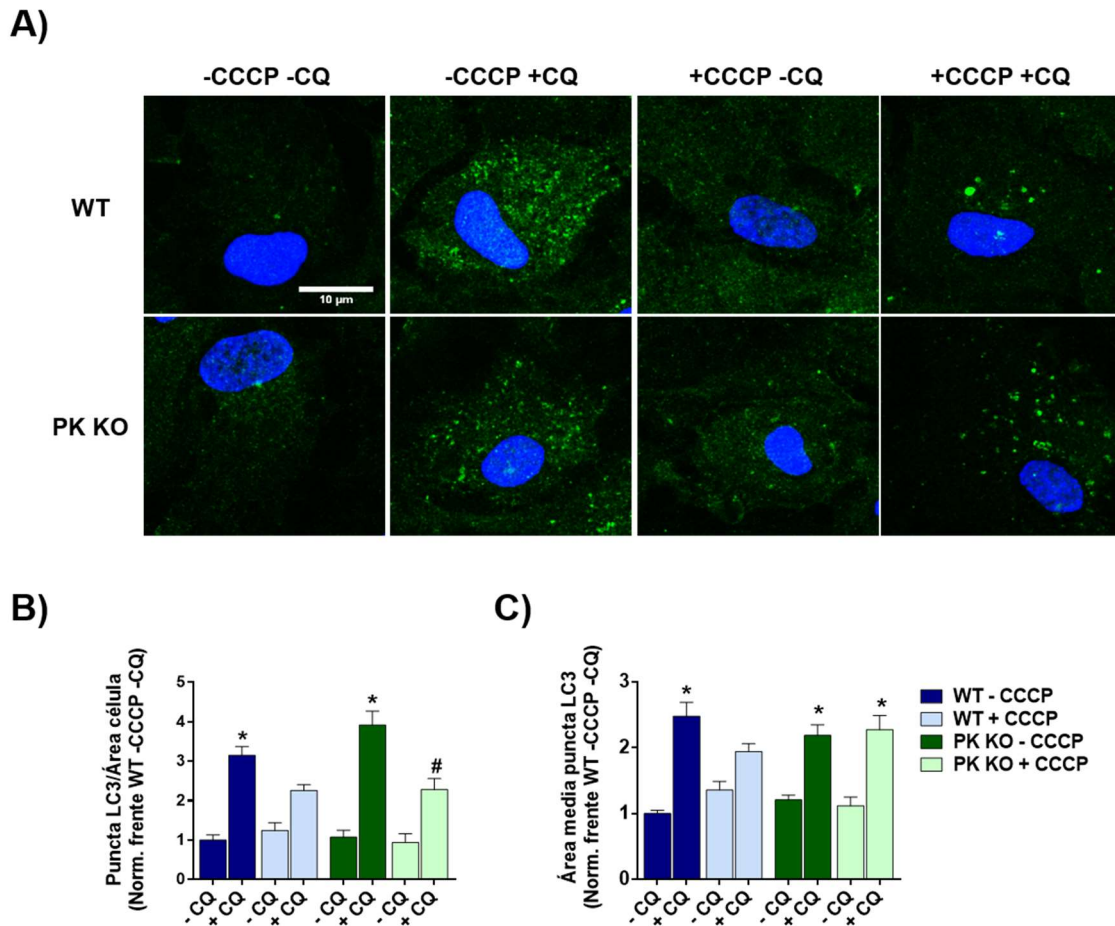
Además, en presencia de CCCP disminuyó el número de autofagosomas en condiciones de bloqueo de la degradación lisosomal en astrocitos WT y PK KO (figura 61; paneles A y B). En cuanto al área de estos orgánulos, se observaron incrementos en ambos tipos de células tras la incubación con CQ (figura 61; paneles A y C).



## Resultados



**Figura 60: Niveles de LC3-I y LC3-II en astrocitos WT y PK KO. Alteraciones con la inducción de daño mitocondrial y el bloqueo de la degradación lisosomal.** A) Western-blot de astrocitos WT y PK KO incubados con anticuerpo frente a LC3 y actina. B) Cuantificación del ratio de intensidades LC3-II/LC3-I. n=3 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y posterior análisis Tukey. \* p<0,05 inducido por CQ. # p<0,05 inducido por la adición de CCCP.

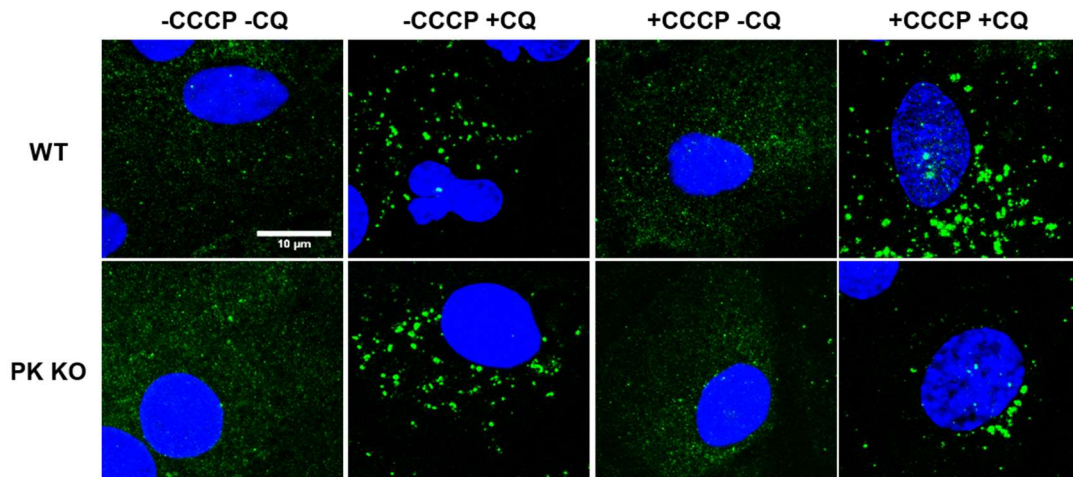


**Figura 61: Inmunomarcaje para LC3 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de CCCP.** A) Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. B) Cuantificación del número de “puncta” positivos para LC3 (autofagosomas). C) Área media de las partículas positivas para LC3. n=20-40 células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la CQ. # p<0,05 debido al CCCP.

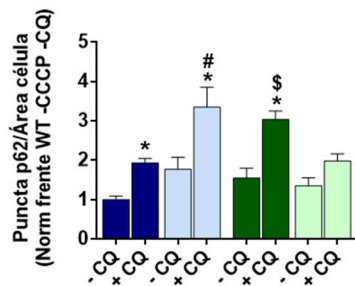
## Resultados

La inducción de daño mitocondrial incrementó el número de partículas positivas para p62 en astrocitos WT (figura 62; paneles A y B). Además, la exposición a CCCP aumentó el área de estas partículas en los dos tipos de células (figura 62; paneles A y C). Estos efectos han sido demostrados en otros trabajos en los que se ha establecido la relación existente entre la ubiquitinación de proteínas mitocondriales mediada por Parkin y el reclutamiento de p62 con el fin de iniciar los procesos de mitofagia (Geisler, Holmstrom et al. 2010, Okatsu, Saisho et al. 2010, Gao, Qin et al. 2015).

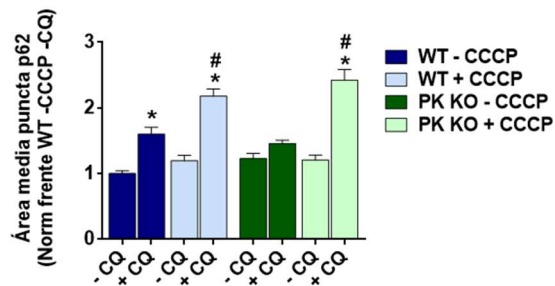
A)



B)



C)

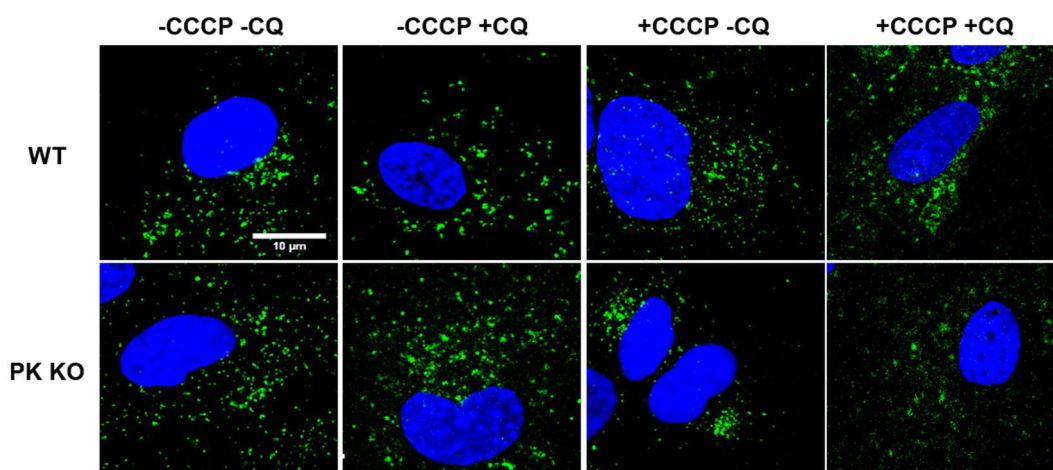


**Figura 62: Inmunomarcado para p62 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la suplementación con CCCP.** A) Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. B) Cuantificación del número de “puncta” positivos para p62. C) Área media de las partículas positivas para p62. n=20-40 células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la CQ. # p<0,05 debido al CCCP. \$ p<0,05 debido a la ausencia de Parkin.

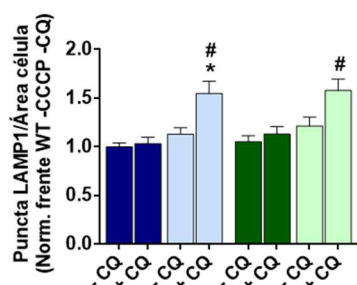
La incubación con CCCP incrementó el número de lisosomas en astrocitos WT y PK KO (figura 63; paneles A y B). Además, se observó una disminución del área media de estos orgánulos en los dos tipos de células (figura 63; paneles A y C). La falta de cambios a nivel lisosomal en presencia de CCCP en astrocitos PK KO podría ser debida a que las células WT y PK KO presentaban iguales tasas de actividad autofágica y, por lo tanto, de llegada de material a degradar en los lisosomas.

## Resultados

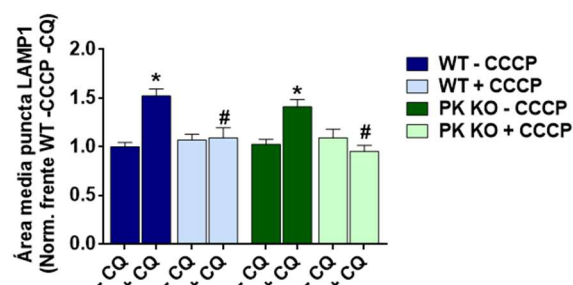
A)



B)



C)



**Figura 63: Inmunomarcaje para LAMP1 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la incubación con CCCP.** A) Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. B) Cuantificación del número de “puncta” positivos para LAMP1 (lisosomas). C) Área media de las partículas positivas para LAMP1. n=20-40 células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la CQ. # p<0,05 debido al CCCP.

### 5.8.2. Actividad mitocondrial

La adición de CCCP incrementó las tasas de consumo de oxígeno iniciales tanto en células WT como PK KO. Además, tras la inyección de FCCP los astrocitos WT presentaban mayores tasas de OCR que las células PK KO (figura 64; panel A).

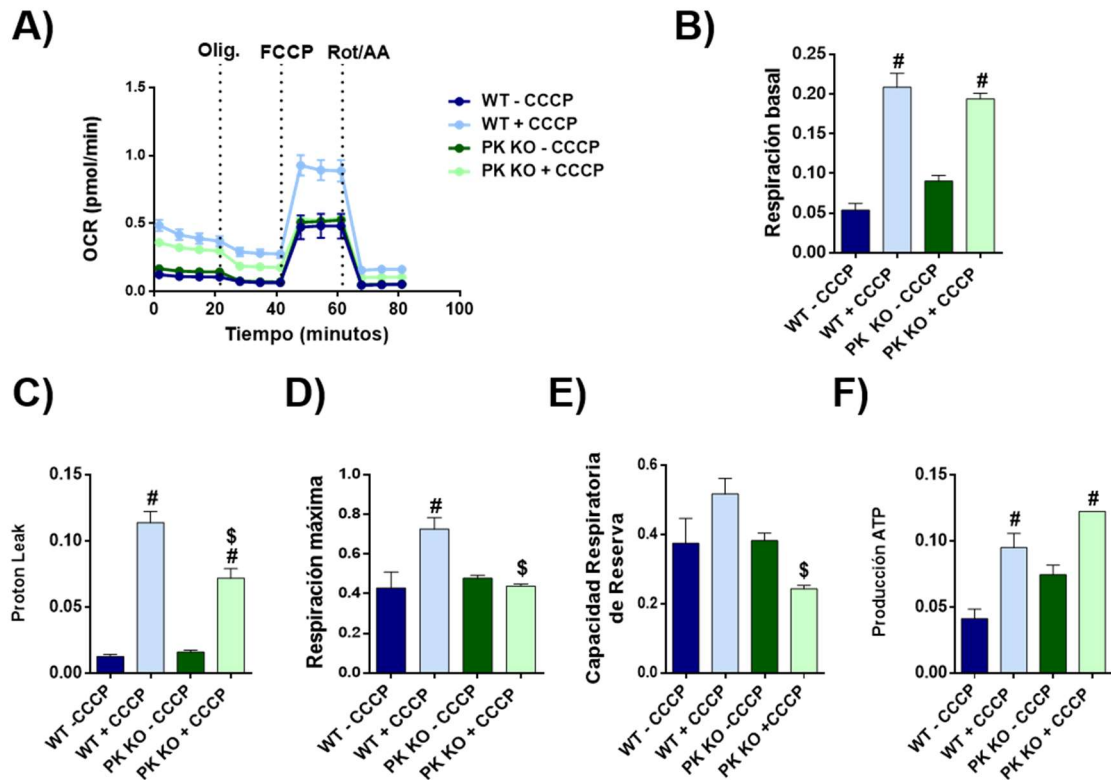
El incremento de la tasa de consumo de oxígeno inicial se tradujo en incrementos de la respiración basal y del “proton leak” provocados por el CCCP, tanto en astrocitos WT como PK KO (figura 64; paneles B y C). Estos incrementos pudieron deberse al efecto protonóforo de este compuesto. Aunque se retiró el CCCP del medio antes de medir el OCR, es posible que aún pudieran detectarse los cambios debidos a este compuesto.

Además, en presencia de CCCP disminuyeron las tasas de respiración mitocondrial máxima y de capacidad respiratoria de reserva solo en astrocitos PK KO (figura 64; paneles D y E), lo que demostró que la supresión de Parkin hacía más



## Resultados

susceptibles a estas células a los efectos dañinos del CCCP, presumiblemente, por el déficit de mitofagia.



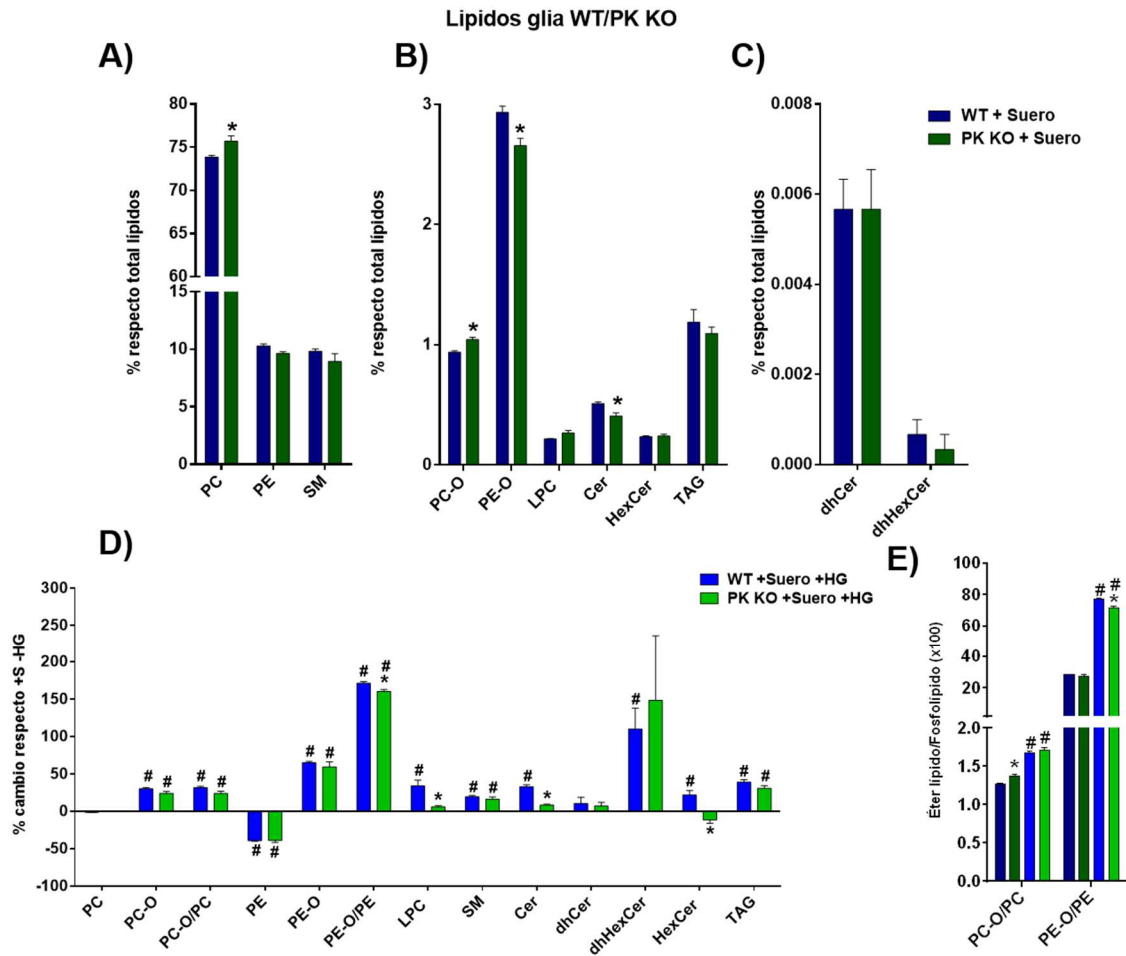
**Figura 64: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Cambios en presencia de CCCP y ausencia de Parkin.** A) Cinéticas de experimentos MitoStress Kit de Seahorse XFp en astrocitos WT y PK KO en ausencia o presencia de CCCP durante seis horas. Se indican los tiempos a los que se inyectaron cada uno de los tres compuestos del kit. Se representan las tasas de consumo de oxígeno divididas entre el número total de células por pocillo. B) Tasa de respiración basal. C) Tasa de "proton leak". D) Tasa de respiración máxima. E) Tasa de capacidad respiratoria de reserva. F) Tasa de producción de ATP. n=9 para condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey. # <0,05 debido a la incubación con CCCP. \$ p<0,05 debido a la ausencia de Parkin.

## 5.9. Efectos de la estimulación de la síntesis de éter lípidos, por incubación con HG, en astrocitos WT y PK KO

### 5.9.1. Alteraciones de la composición lipídica

La adición de HG es capaz de alterar la composición lipídica de células en cultivo incrementando los niveles de éter lípidos, pero también modificando los niveles de otras clases lipídicas (Bergan, Skotland et al. 2013). Se analizó la composición lipídica de astrocitos WT y PK KO en cultivo con el fin de determinar si existían alteraciones con la eliminación de Parkin y la incubación con HG.

## Resultados



**Figura 65: Cambios en la composición lipídica de astrocitos causados por la eliminación de Parkin y la adición de HG.** A) Porcentajes de PC, PE y SM respecto al total de lípidos. B) Porcentajes de PC-O, PE-O y LPC, Cer, HexCer y TG respecto al total de lípidos. C) Porcentajes de dhCer y dhHexCer respecto al total de lípidos. D) Porcentajes de cambio de las distintas clases lipídicas inducidos por la incubación con HG. F) Ratio éter lípido/fosfolípido en astrocitos WT y PK KO en ausencia o presencia de HG. n=3 para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student. \*  $p < 0,05$  debido a la ausencia de Parkin. #  $p < 0,05$  debido a la incubación con HG.

Los astrocitos PK KO presentaban alteraciones en distintas clases de lípidos. Estas células presentaban mayores niveles de PC (figura 65; panel A) y PC-O (figura 65; panel B), y menores de PE-O (figura 65; panel B) y de Cer (figura 65; panel B).

La suplementación con HG promovió profundos cambios en la composición lipídica de astrocitos WT y PK KO (figura 65; panel D). Como era de esperar, en presencia de HG aumentaron PC-O y PE-O en ambos tipos de células, siendo los cambios mayores en PE-O (figura 65; panel D). En cuanto a los fosfolípidos, PE disminuyó tanto en células WT como PK KO, mientras que PC no se vio afectada (figura 65; panel D). Todos estos resultados provocaron que los ratios éter lípido/fosfolípido aumentasen para PC-O y PE-O, siendo éstos mucho mayores para PE-O, en los dos tipos de células tras la adición con HG (figura 65; panel E).

Además de los cambios en fosfolípidos, la presencia de HG alteró los niveles de otras clases lipídicas. Aumentaron los niveles de SM, dhCer, dhHexCer y TAG en los dos

## Resultados

tipos de células, y LPC, Cer y HexCer solo en células WT (figura 65; panel D). Estas modificaciones se debieron, seguramente, a la transferencia de HG desde los éter lípidos a estas clases lipídicas.

Estos resultados confirmaron que en presencia de HG aumentaba la abundancia de éter lípidos de astrocitos en cultivo. Además, al igual que en otros tipos celulares, se produjeron incrementos de otras clases lipídicas. Se desconocen los mecanismos que implicaron el aumento de determinadas clases lipídicas exclusivamente en células WT. Por último, la suplementación con HG disminuyó los niveles de PE, lo que no había sido descrito en otros tipos celulares.

### 5.9.1.1. Cambios en las especies de PC, PC-O, PE y PE-O

Para profundizar sobre los efectos de la adición de HG, se analizaron las distintas especies lipídicas de fosfolípidos y éter lípidos usando el software informático MetaboAnalyst.

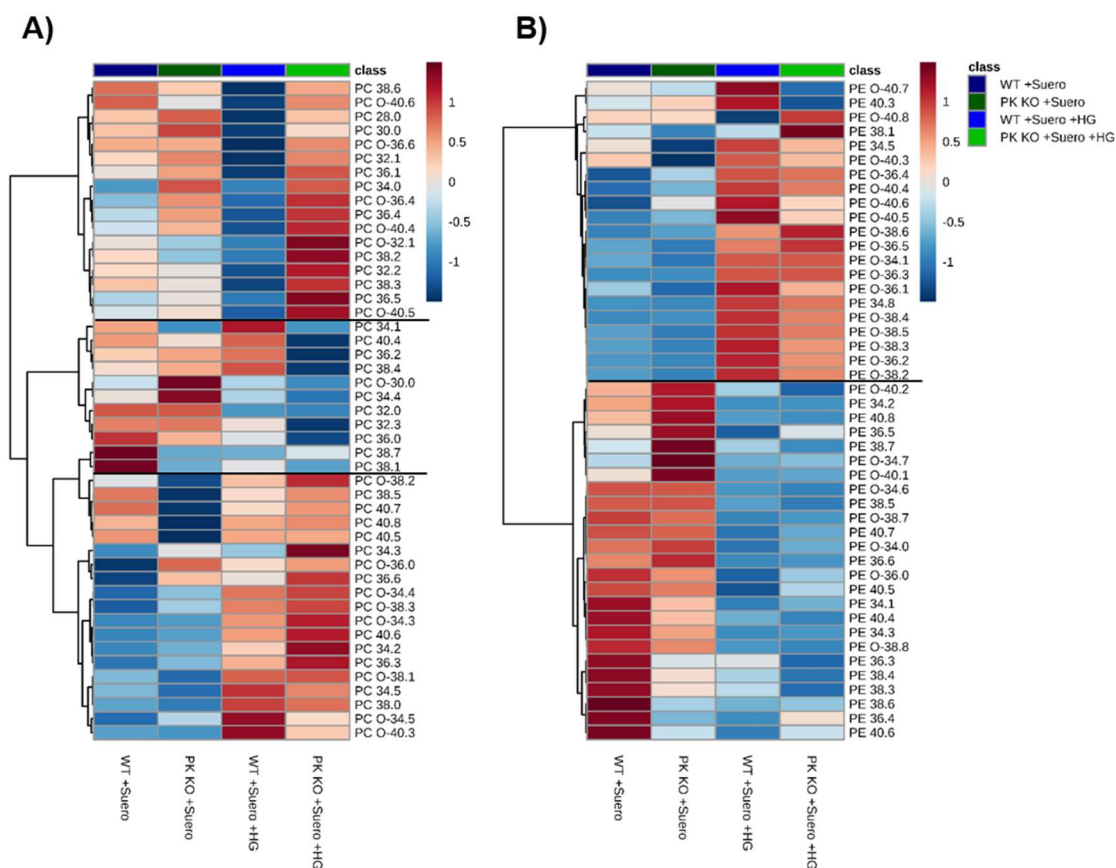
Las especies de PC y PC-O mostraron cambios heterogéneos tras la suplementación con HG (figura 66; panel A). Las especies de estas clases lipídicas se englobaron en tres grupos: especies que disminuyeron en astrocitos WT tras la incubación con HG (figura 66; parte superior del panel A), especies en las que la disminución se produjo en las células PK KO (figura 66; parte intermedia panel A), y un último grupo que aumentó tanto en células WT como PK KO (figura 66; parte inferior del panel A). En este último grupo se encuadraron la mayoría de las especies de PC-O detectadas.

Los cambios de las especies de PE y PE-O en presencia de HG fueron mucho más homogéneos. Prácticamente todas las especies de PE-O aumentaron en células WT y PK KO, mientras que disminuyeron todas las especies de PE en estas condiciones (figura 66; panel B). Estos resultados indicaron que en presencia de HG se inhibieron, al menos en parte, la síntesis de novo de PE o la remodelación de lípidos para producir PE, aunque en este punto se desconocen los mecanismos implicados en la disminución de los niveles de esta clase lipídica.

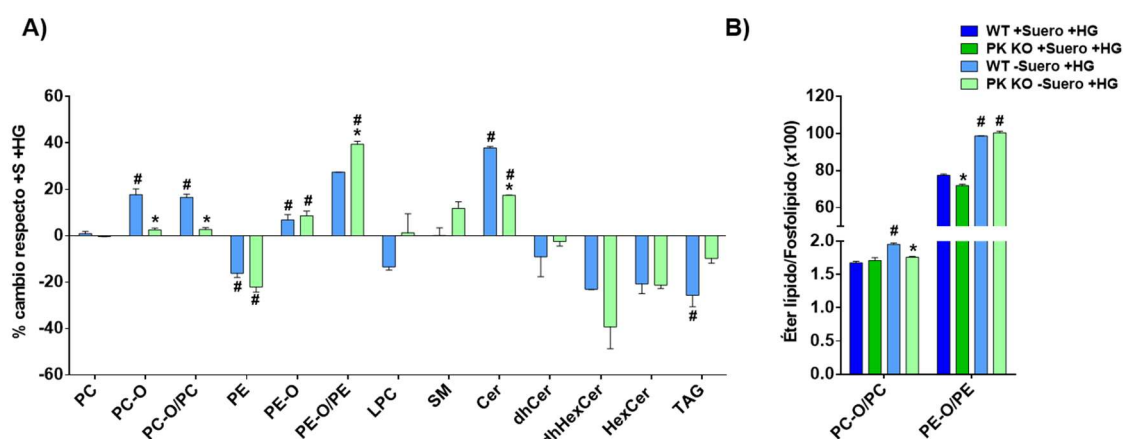
### 5.9.2. Cambios lipídómicos en condiciones de ayuno

La retirada de suero en presencia de HG incrementó el porcentaje de PC-O en células WT y de PE-O en astrocitos WT y PK KO (figura 67; panel A). Mientras tanto, PC no se vio alterada y PE disminuyó en los dos tipos de células (figura 67; panel A) (descenso de todas las formas mayoritarias; datos no mostrados). Por lo tanto, el ratio PC-O/PC solo aumentó en células WT indicando una implicación de Parkin en la incorporación de HG a esta clase lipídica, y el ratio PE-O/PE aumentó en los dos tipos de células (figura 67; panel B). Además, se produjeron modificaciones en otras especies lipídicas. Aumentaron las Cer, sobre todo en células WT, y las dhCer, dhHexCer, HexCer y TAG presentaron menores porcentajes tanto en astrocitos WT como PK KO (figura 67; panel B). Estos cambios pudieron deberse al metabolismo lipídico activado en condiciones de ayuno.

## Resultados



**Figura 66:** Especies de PC, PC-O, PE y PE-O en astrocitos WT y PK KO y modificaciones causadas por el HG. **A)** Análisis mediante software Metaboanalyst de las especies de PC y PC-O. **B)** Análisis mediante software Metaboanalyst de las especies de PE y PE-O. n=3 para cada condición. Para estos análisis se han utilizado los porcentajes de los niveles de cada clase lipídica respecto al total de lípidos.



**Figura 67:** Cambios en la composición lipídica de astrocitos WT y PK KO inducidos por la retirada de suero en presencia de HG. **A)** Porcentajes de cambio de cada una de las clases lipídicas detectadas en respuesta a la retirada de suero en presencia de HG. **B)** Ratio éter lípido/fosfolípido en astrocitos WT y PK KO en presencia de HG y en presencia o ausencia de

## Resultados

suero.  $n=3$  para cada condición. Análisis estadístico mediante  $t$  de Student. \*  $p<0,05$  debido a la ausencia de Parkin. #  $p<0,05$  debido a la retirada de suero.

Tras la retirada de suero, el ratio PE-O/PE aumentó hasta el 100% en los dos tipos de células indicando que en estas condiciones las células presentaban las mismas cantidades de PE-O que de PE (figura 67; panel B), lo que podría tener implicaciones sobre la lipidación de LC3.

### 5.9.2.1. Alteraciones de PC-O y PE-O

La retirada de suero en presencia de HG promovió cambios diferentes de PC-O y PE-O en astrocitos WT y PK KO. Se detectaron especies de PC-O y PE-O que aumentaron solo en células WT (figura 68; parte superior), PK KO (figura 68; parte intermedia), o en los dos tipos de células (figura 68; parte inferior). Estos resultados demostraron que la regulación de las distintas especies de PC-O y PE-O en respuesta a la suplementación con HG y a la posterior retirada de suero dependía en parte de la proteína Parkin.

Por lo tanto, en condiciones de activación de autofagia y, por consiguiente, de incremento de los procesos de formación de autofagosomas que implican la lipidación de LC3 mediante su unión a PE, la abundancia de esta clase lipídica disminuían en presencia de HG. Además, en estas condiciones PE-O y PE presentaban los mismos valores, lo que podría implicar que la lipidación de LC3 pudiese darse por unión a PE-O en vez de PE. Por otro lado, la eliminación de Parkin alteró de manera significativa el porcentaje de PC-O tras la retirada de suero indicando que esta proteína estaría implicada en procesos encaminados a la síntesis específica de esta clase lipídica.

### 5.9.3. Actividad autofágica tras retirada de suero

A continuación, se estudió si la estimulación de la síntesis de éter lípidos era capaz de modular la actividad autofágica en astrocitos WT y PK KO en condiciones basales y en condiciones de ayuno.

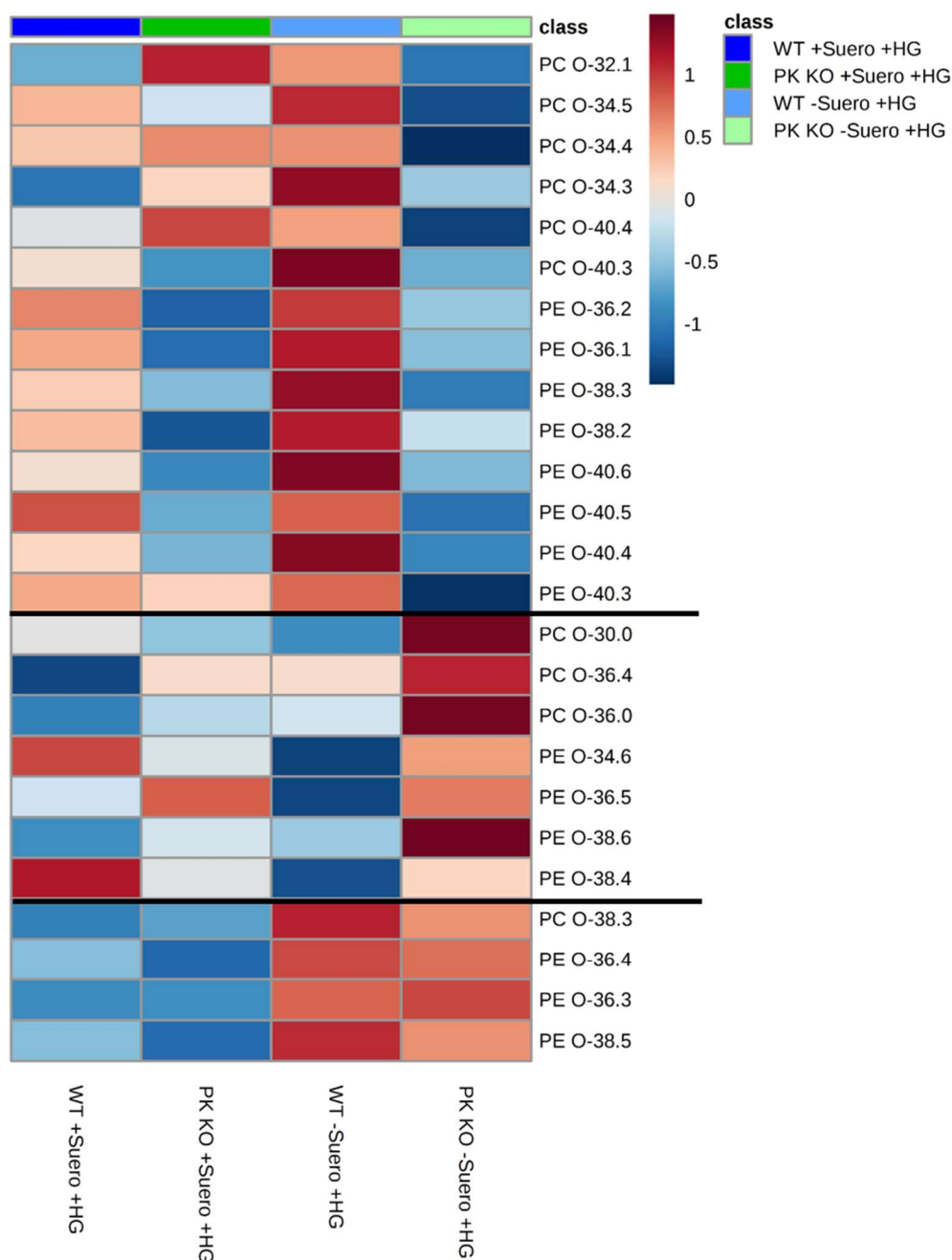
En condiciones basales, la adición de HG no alteró el ratio LC3-II/LC3-I en presencia de CQ y, por lo tanto, no afectó a la actividad autofágica ni en células WT ni en células PK KO (figura 69; paneles A y B). En cambio, en ausencia de suero la suplementación con HG incrementó el ratio LC3-II/LC3-I en células WT (figura 69; paneles A y B) indicando que en estas condiciones el aumento de la síntesis de éter lípidos promovido por el HG estimulaba la actividad autofágica. Estos efectos también se detectaron al analizar la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (figura 69; panel C).

Se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia con el fin de determinar el número y el área media de autofagosomas y lisosomas.

En presencia de suero, la incubación con HG no alteró ni el número ni el área de los autofagosomas en astrocitos WT o PK KO (figura 70; paneles A, B y D). Sin embargo,

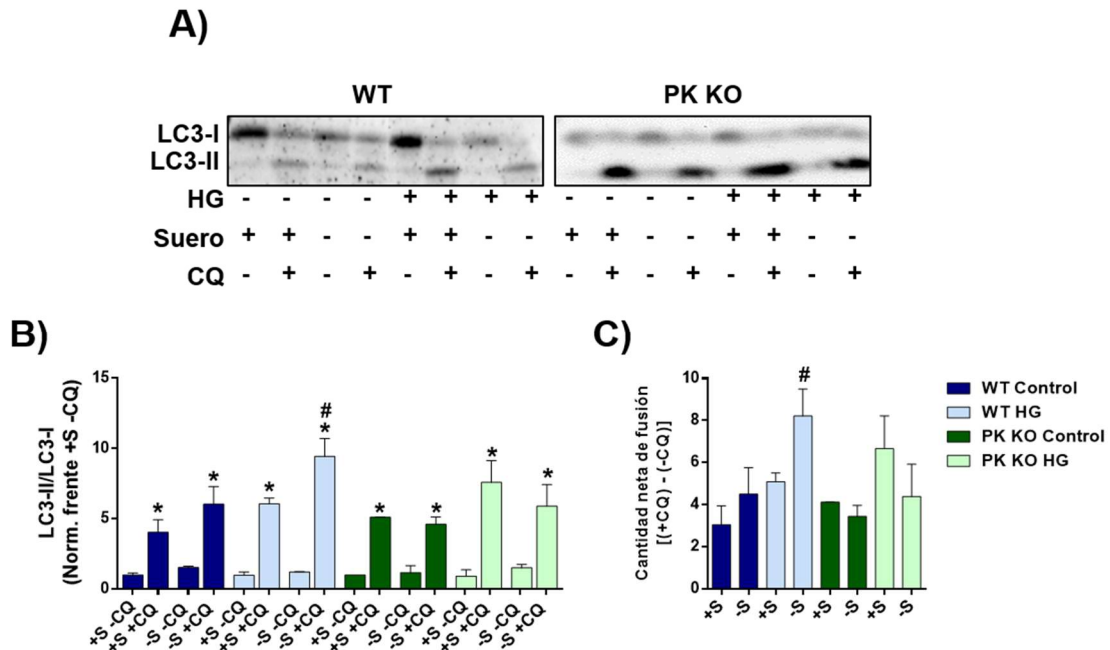
## Resultados

cuando se retiró el suero en presencia de HG, aumentó el número y el área de los autofagosomas en las células WT (figura 70; panel A, B y D). Además, tras la estimulación de la síntesis de éter lípidos los astrocitos WT presentaban un mayor número de autofagosomas que los PK KO, tanto en presencia como en ausencia de suero (figura 70; panel B). Todos estos efectos se observaron al cuantificar la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (figura 70; panel C).



**Figura 68: Especies de PC-O y PE-O en astrocitos WT y PK KO y cambios con la retirada de suero en presencia de HG.** Análisis mediante software Metaboanalyst. n=3 para cada condición. Para estos análisis se han utilizado los porcentajes de los niveles de cada clase lipídica respecto al total de lípidos.

## Resultados



**Figura 69: Niveles de LC3-I y LC3-II en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la adición de HG, la retirada de suero y el bloqueo de la degradación lisosomal. A)** Western-blot de astrocitos WT y PK KO incubados con anticuerpo frente a LC3. **B)** Cuantificación del ratio de intensidades LC3-II/LC3-I. **C)** Cuantificación de la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (Resta del ratio LC3-II/LC3-I en presencia de CQ menos en ausencia de CQ). n=3 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y posterior análisis Tukey. \* p<0,05 inducido por CQ. # p<0,05 inducido por HG.

La presencia de HG en condiciones basales no alteró el número de partículas positivas para p62 en astrocitos WT o PK KO (figura 71; paneles A y B). Sin embargo, al quitar el suero en presencia de HG, se produjo un incremento de estas partículas en células WT (figura 71; paneles A y B). En estas condiciones, las células WT presentaban más partículas positivas para p62 que las células PK KO (figura 71; paneles A y B). Los efectos debidos al HG eran los mismos que los observados al analizar las partículas positivas para LC3 (autofagosomas) indicando que existía una activación de la autofagia en condiciones de ayuno, y que ésta era dependiente de Parkin.

En presencia de suero la incubación con HG no alteró el número o el área media de lisosomas en astrocitos WT y PK KO (figura 72; paneles A, B y C). En cambio, si se retiraba el suero en presencia de HG, el número de lisosomas y el área de los mismos aumentaba en las células WT (figura 72; paneles A, B y C). En estas condiciones, las células WT tenían más lisosomas y éstos eran más grandes que en células PK KO (figura 72; paneles A, B y C). El incremento del número y del área de los lisosomas inducido por la retirada de suero y la estimulación de la síntesis de éter lípidos demostraron que los autofagosomas formados en las células WT en estas condiciones se fusionaban con los lisosomas.

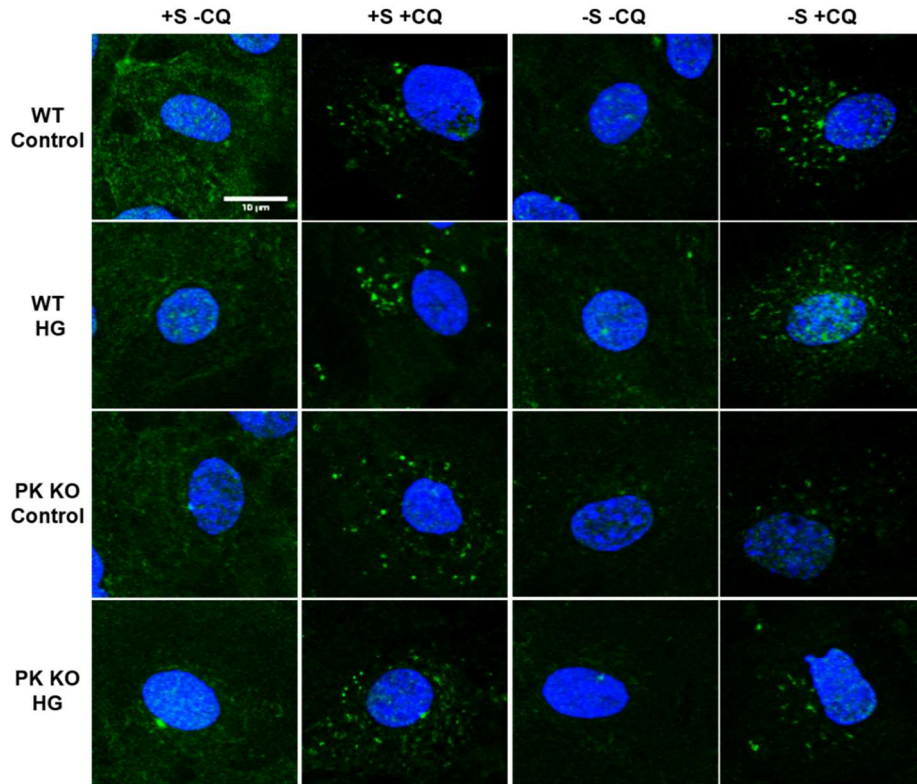
Los resultados obtenidos en los experimentos de western-blot e inmunofluorescencia (figuras 69-72) demostraron que el aumento de éter lípidos favoreció el incremento de la actividad autofágica en ausencia de suero en astrocitos en



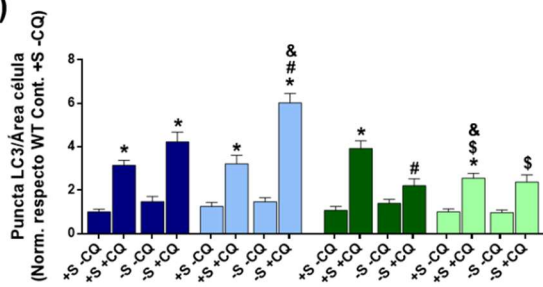
## Resultados

cultivo. Además, este proceso requería la proteína Parkin, ya que en las células PK KO no se produjo esta activación. El aumento de la biosíntesis de autofagosomas correspondió a una respuesta no patológica ya que llegaban a los lisosomas para descargar su contenido, y la acumulación de autofagosomas y el incremento del tamaño de los lisosomas solo se observó en aquellas condiciones en las que se bloqueó la degradación lisosomal.

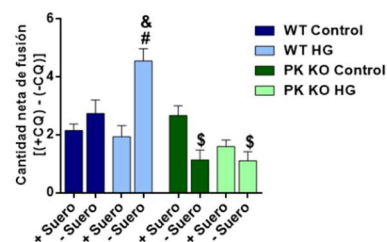
A)



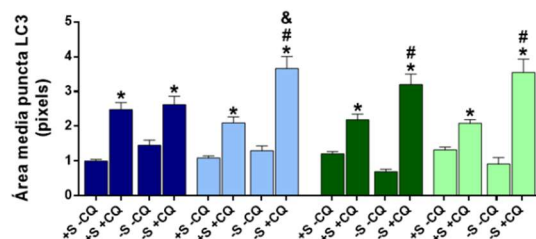
B)



C)



D)



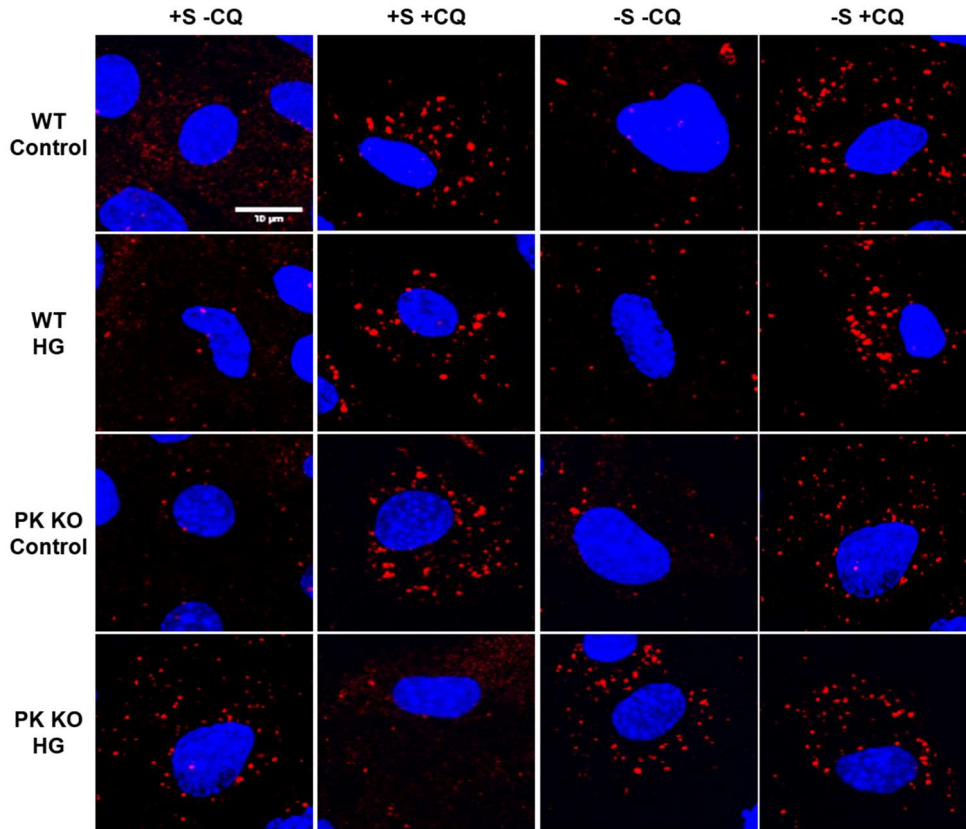
**Figura 70: Inmunomarcaje para LC3 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la suplementación con HG y la inducción de autofagia. A)** Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. **B)** Cuantificación del número de “puncta” positivos para LC3



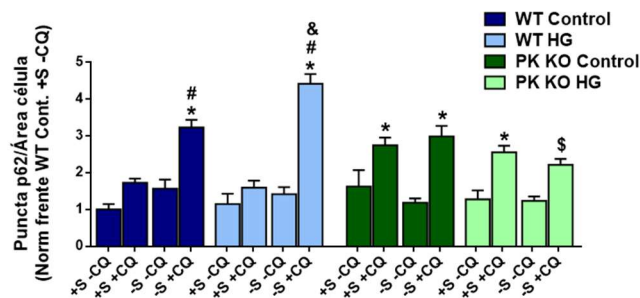
## Resultados

(autofagosomas). **C)** Cuantificación de la cantidad neta de fusión entre autofagosomas y lisosomas (Resta del número de puncta positivos para LC3 en presencia de CQ menos en ausencia de CQ). **D)** Área media de las partículas positivas para LC3.  $n=20-40$  células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \*  $p<0,05$  debido a la CQ. #  $p<0,05$  debido a la retirada de suero. \$  $p<0,05$  debido a la supresión de Parkin. &  $p<0,05$  debido a la adición de HG.

**A)**



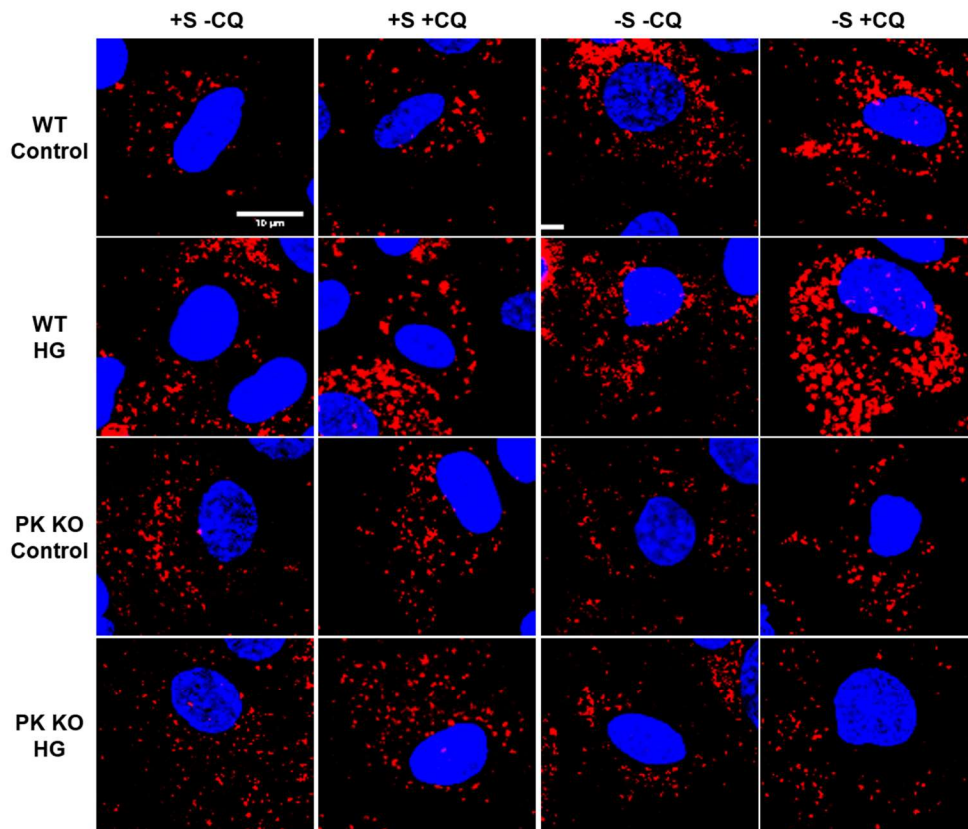
**B)**



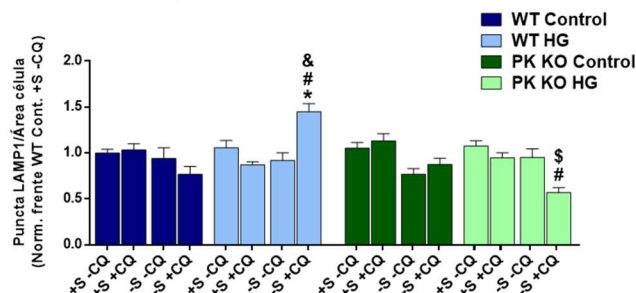
**Figura 71: Inmunomarcaje para p62 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de HG y del ayuno. A)** Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. **B)** Cuantificación del número de “puncta” positivos para p62.  $n=20-40$  células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \*  $p<0,05$  debido a la CQ. #  $p<0,05$  debido a la retirada de suero. \$  $p<0,05$  debido a la delección de Parkin. &  $p<0,05$  debido a la adición de HG.

## Resultados

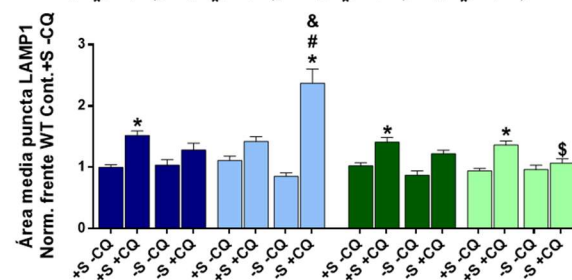
A)



B)



C)



**Figura 72: Inmunomarcado para LAMP1 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de HG y de la retirada de suero. A)** Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. **B)** Cuantificación del número de “puncta” positivos para LAMP1 (lisosomas). **C)** Área media de las partículas positivas para LAMP1. n=20-40 células de 3 experimentos distintos por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la CQ. # p<0,05 debido a la retirada de suero. \$ p<0,05 debido a la ausencia de Parkin. & p<0,05 debido a la adición de HG.

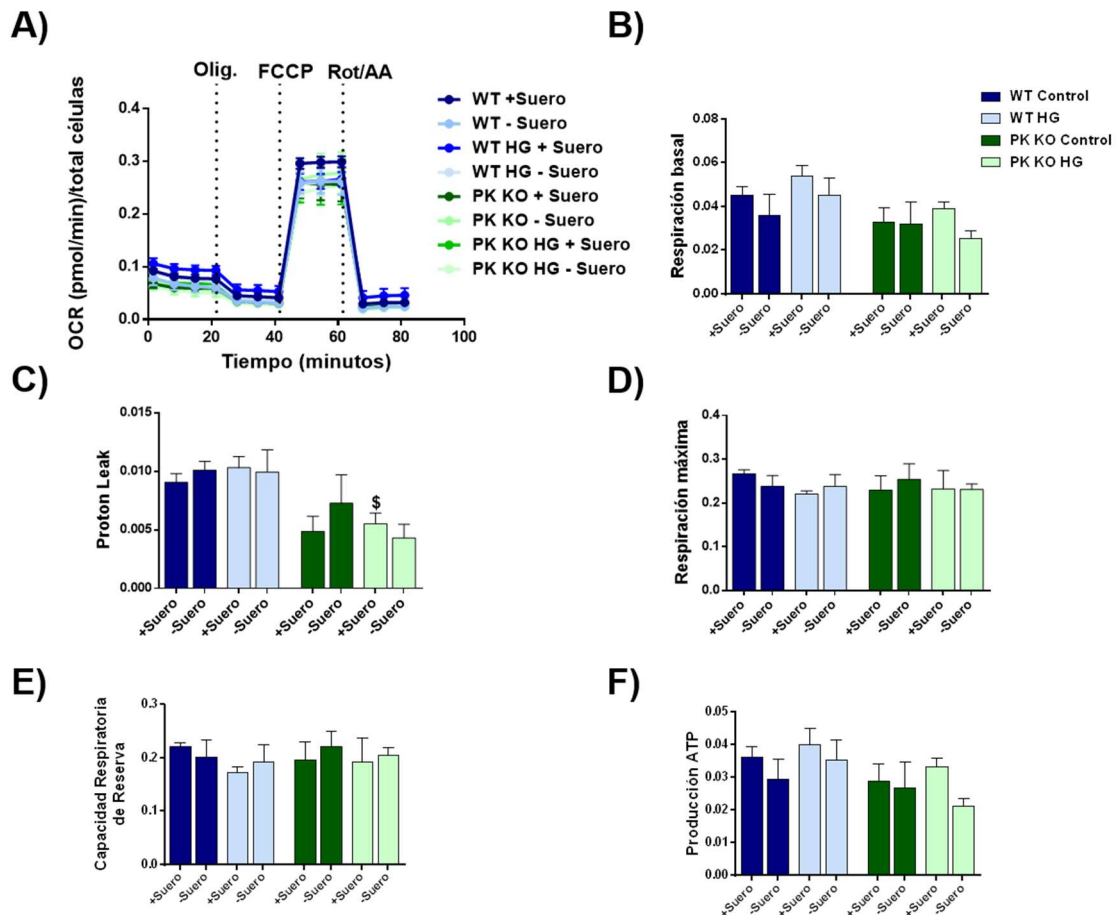
## Resultados

### 5.9.4. Funcionalidad mitocondrial en ausencia de suero

A continuación, se quiso estudiar si aparte de los efectos sobre la actividad autofágica, la adición de HG en condiciones basales o en ayuno tenía algún efecto sobre la funcionalidad mitocondrial.

La suplementación con HG no indujo cambios significativos en el OCR en astrocitos WT o PK KO (figura 73; panel A). En presencia de HG no se alteraron los valores de los distintos parámetros calculados a partir de las cinéticas de consumo de oxígeno (figura 73; paneles B-F). Sin embargo, la retirada de suero en presencia de HG disminuyó la respiración basal, el proton leak y la producción de ATP en células PK KO (figura 73; paneles B, C y F; diferencias estadísticamente no significativas); indicando que en condiciones de estimulación de la síntesis de éter lípidos, la proteína Parkin jugaba algún papel en el mantenimiento de las tasas de estos parámetros.

La ausencia clara de efectos del HG en condiciones de ayuno (al contrario de lo que ocurría con la actividad autofágica) indicó que, en estas condiciones, la funcionalidad mitocondrial era independiente de los niveles de éter lípidos en astrocitos en cultivo.



**Figura 73: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la suplementación con HG y la inducción de autofagia.** A) Cinéticas de experimentos MitoStress Kit de Seahorse XFp en astrocitos WT y PK KO en ausencia o presencia de HG y suero. Se indican los tiempos a los que se inyectaron cada uno de los tres compuestos del kit. Se representan las tasas de consumo de oxígeno divididas entre el número total de células por pocillo. B) Tasas de

## Resultados

respiración basal. C) Tasas de “proton leak”. D) Tasas de respiración máxima. E) Tasas de capacidad respiratoria de reserva. F) Tasas de producción de ATP. n=6 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey.

### 5.9.5. Modificaciones de la composición lipídica por la incubación con CCCP

Tras caracterizar los efectos de la estimulación de la síntesis de éter lípidos en condiciones de activación de autofagia se quisieron estudiar los posibles efectos del incremento de esta clase lipídica en condiciones de daño mitocondrial. En primer lugar, se determinaron los cambios en la composición lipídica de astrocitos WT y PK KO tras la adición de CCCP en presencia de HG.

La incubación con CCCP en presencia de HG alteró los niveles de distintas clases lipídicas. Distintas clases de fosfolípidos variaron en células PK KO; disminuyeron PC, PC-O y aumentó PE (figura 74; panel A). En cuanto a los ratios éter lípido/fosfolípido, disminuyó PE-O/PE tanto en células WT como en células PK KO (figura 74; panel B). Se observaron modificaciones muy heterogéneas en las distintas especies de PC, PC-O, PE y PE-O en respuesta a la inducción de daño mitocondrial en presencia de HG (datos no mostrados).

En cuanto a las otras clases lipídicas, se observaron cambios diferenciales entre astrocitos WT y PK KO en SM, Cer y HexCer (figura 74; panel A). SM y Cer aumentaron en células PK KO y HexCer disminuyó menos en este tipo de células que en astrocitos WT (figura 74; panel A). Las células WT presentaron una menor variación de la composición lipídica en respuesta a la exposición a CCCP en presencia de HG que las células PK KO; indicando que las células WT respondían de manera más adecuada a la inducción de daño mitocondrial. En las células PK KO, la ausencia de Parkin y de los procesos de mitofagia desencadenaron una desregulación de distintas clases de lípidos en presencia de CCCP.

### 5.9.6. Actividad autofágica en condiciones de daño mitocondrial

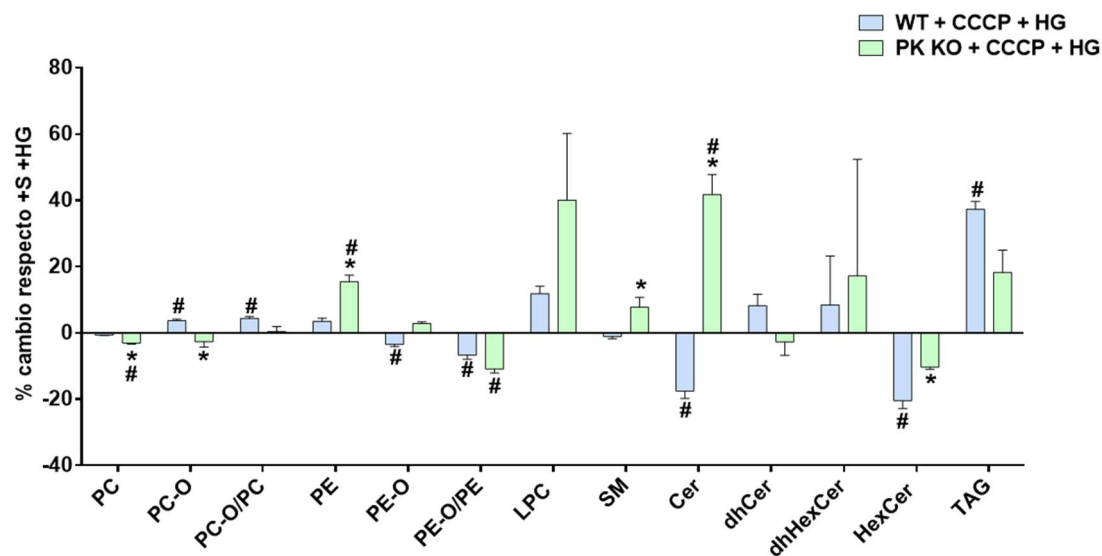
A continuación, se analizó si en presencia de HG la exposición a CCCP alteraba la tasa de actividad autofágica en astrocitos WT o PK KO.

La suplementación con CCCP en presencia de HG no modificó la actividad autofágica en astrocitos en cultivo (figura 75; paneles A y B). Por lo tanto, en estas condiciones, el aumento de éter lípidos no activó la autofagia. Como ya se ha comentado en este trabajo, el hecho de que no aumentase el ratio LC3-II/LC3-I en presencia de CCCP no significaba que no se estuviesen activando procesos de mitofagia con el fin de eliminar las mitocondrias dañadas.

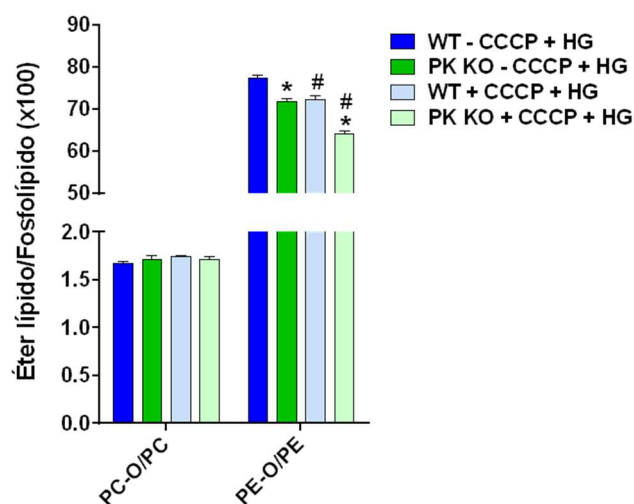
Se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para estudiar el número y el área de autofagosomas y lisosomas tras la inducción de daño mitocondrial en presencia de HG.

## Resultados

A)

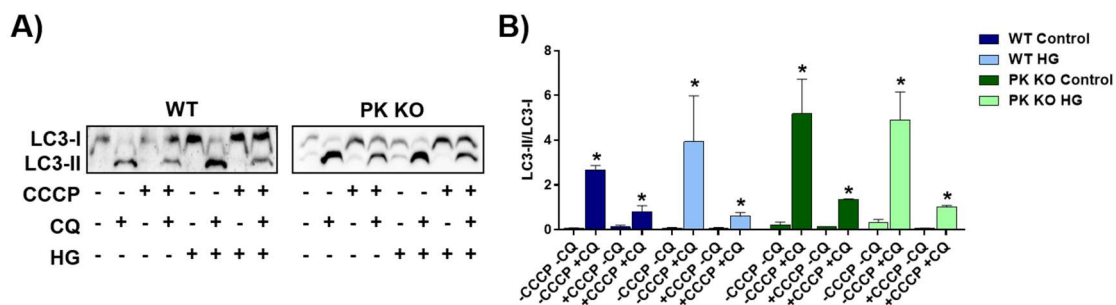


B)



**Figura 74: Cambios en la composición lipídica de astrocitos WT y PK KO tras la inducción de mitofagia en presencia de HG.** A) Porcentajes de cambio de cada una de las clases lipídicas detectadas en respuesta a la incubación con CCCP en presencia de HG. B) Ratio éter lípido/fosfolípido en astrocitos WT y PK KO. n=3 para cada condición. Análisis estadístico mediante t de Student. \* p<0,05 debido a la ausencia de Parkin. # p<0,05 debido a la retirada de suero.

## Resultados



**Figura 75: Niveles de LC3-I y LC3-II en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la adición de HG, la inducción de daño mitocondrial y el bloqueo de la degradación lisosomal. A)** Western-blot de astrocitos WT y PK KO incubados con anticuerpo frente a LC3. **B)** Cuantificación del ratio de intensidades LC3-II/LC3-I. n=3 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y posterior análisis Tukey. \* p<0,05 inducido por la CQ.

La exposición a CCCP en estas condiciones no alteró el número o el área de los autofagosomas en astrocitos en cultivo (figura 76; paneles A-C). Estos resultados indicaron que la inducción de daño mitocondrial tras la estimulación de la síntesis de éter lípidos no alteraba las tasas de actividad autofágica, corroborando lo observado en experimentos de western-blot.

El número de partículas positivas para p62 disminuyó en células PK KO tras la incubación de CCCP en presencia de HG (figura 77; paneles A y B). En estas condiciones, las células WT presentaban un número mayor de estas partículas que las células PK KO (figura 77; panel B). Por lo tanto, no se alteraron los procesos de reclutamiento de p62 a mitocondrias con proteínas ubiquitinadas por Parkin en las células WT, y en consecuencia, no incrementaron los procesos de mitofagia en estas células.

Por último, no se observaron cambios en el número de lisosomas o en el área de los mismos en astrocitos en cultivo (figura 77; paneles A-C). La falta de variaciones pudo deberse a que en estas condiciones no se produjo activación de autofagia y, por lo tanto, no aumentó la llegada de material a degradar a los lisosomas.

Como resumen de los experimentos de inmunofluorescencia en astrocitos WT y PK KO en presencia de CCCP y HG, no se produjeron cambios ni en el número, ni en el área de autofagosomas o lisosomas. Esto indicó que la captación de éter lípidos por células WT y PK KO no se traducían en un incremento de la actividad de la maquinaria autofágica ni de la llegada de material intracelular a los lisosomas para su degradación en estas condiciones.

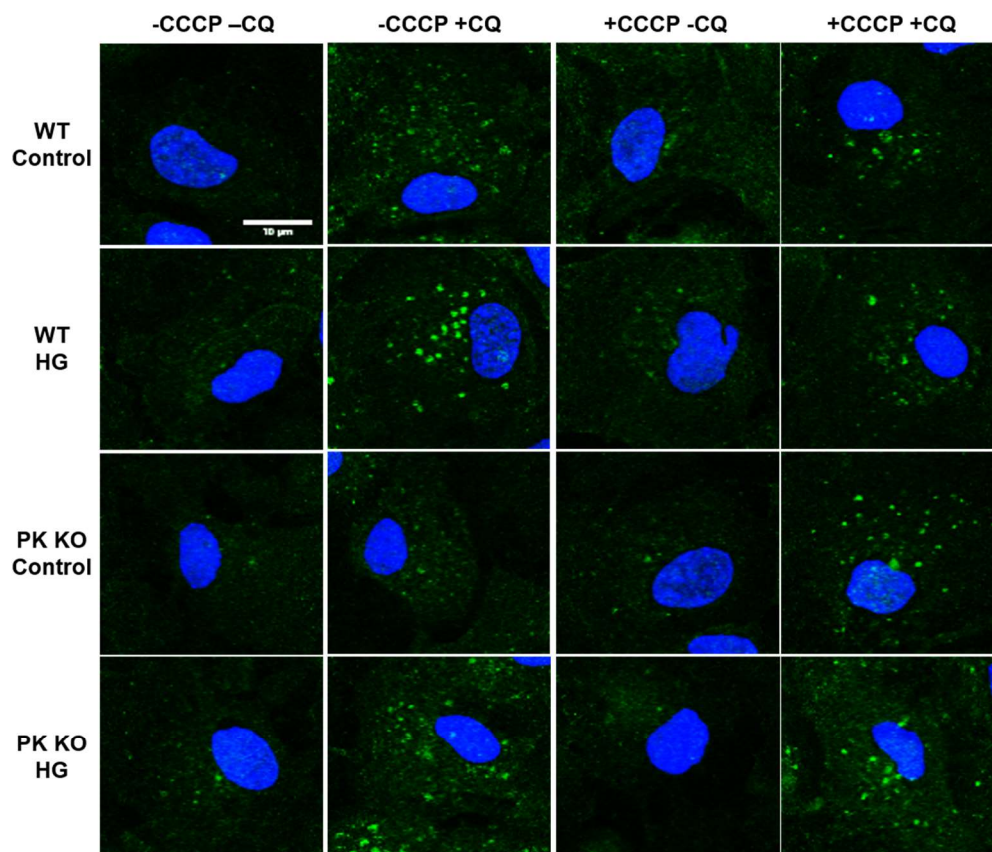
Este hecho contrastaba con los efectos observados tras la adición de HG y la retirada de suero. En estas condiciones, el aumento de los niveles de éter lípidos en los astrocitos incrementó la actividad de la maquinaria autofágica y la llegada de material intracelular a los lisosomas para su degradación en células WT.

Todos estos resultados mostraron que el incremento de los niveles de éter lípidos en astrocitos era utilizado para modular distintos procesos en células WT o PK KO en condiciones de activación de autofagia o de daño mitocondrial.

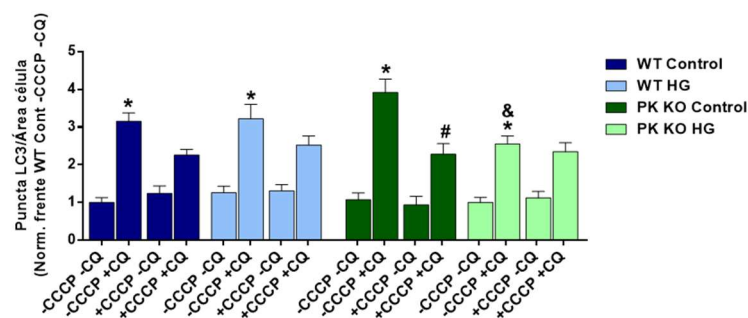


## Resultados

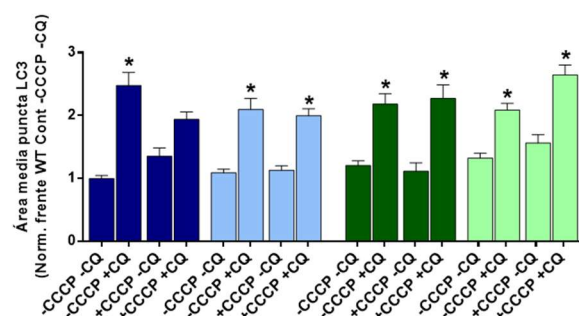
A)



B)



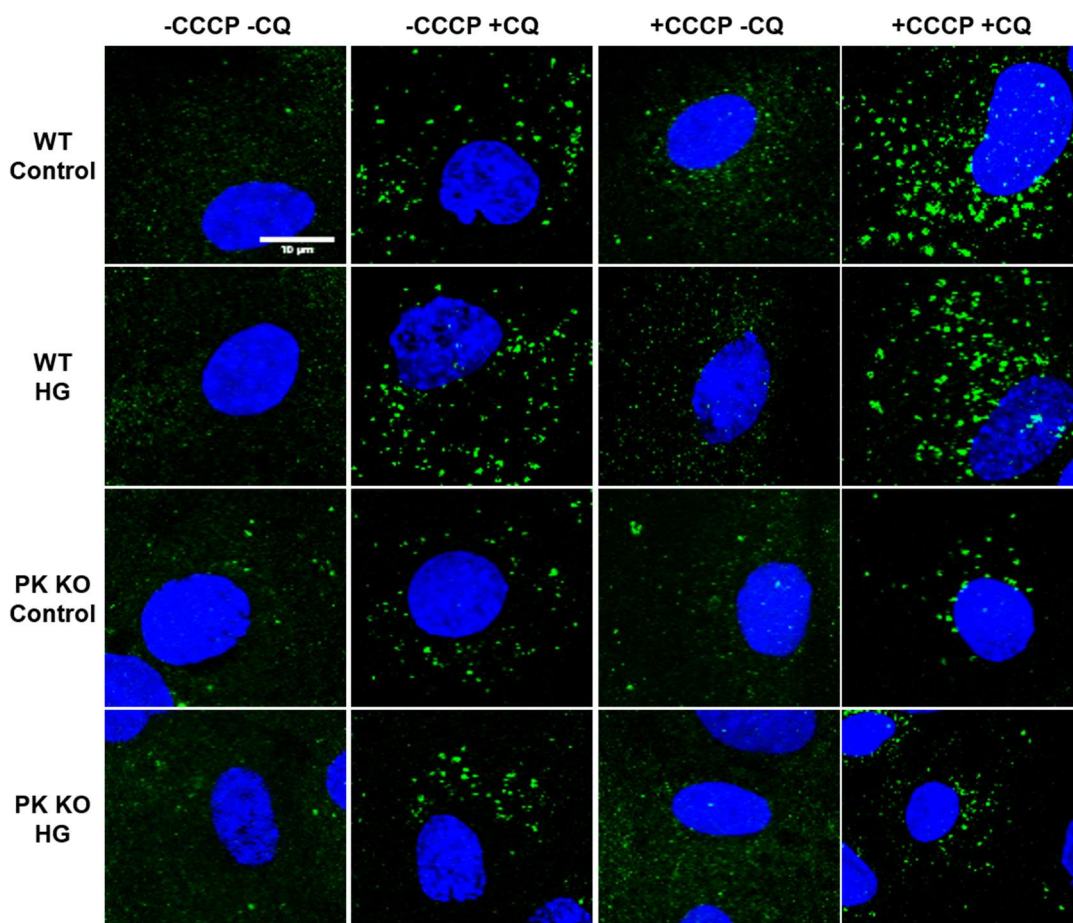
C)



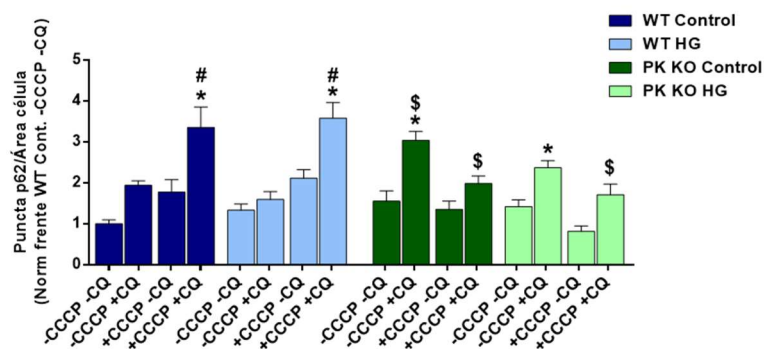
**Figura 76: Inmunomarcaje para LC3 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de HG y CCCP.** A) Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. B) Cuantificación del número de “puncta” positivos para LC3 (autofagosomas). C) Área media de las partículas positivas para LC3. n=20-40 células por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la CQ.

## Resultados

A)



B)



**Figura 77: Inmunomarcaje para p62 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la adición de HG y de la inducción de mitofagia.** A) Imágenes representativas de las distintas condiciones ensayadas. B) Cuantificación del número de “puncta” positivos para p62. n=20-40 células por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \* p<0,05 debido a la CQ. # p<0,05 debido a la adición de CCCP. \$ p<0,05 debido a la ausencia de Parkin.



Resultados

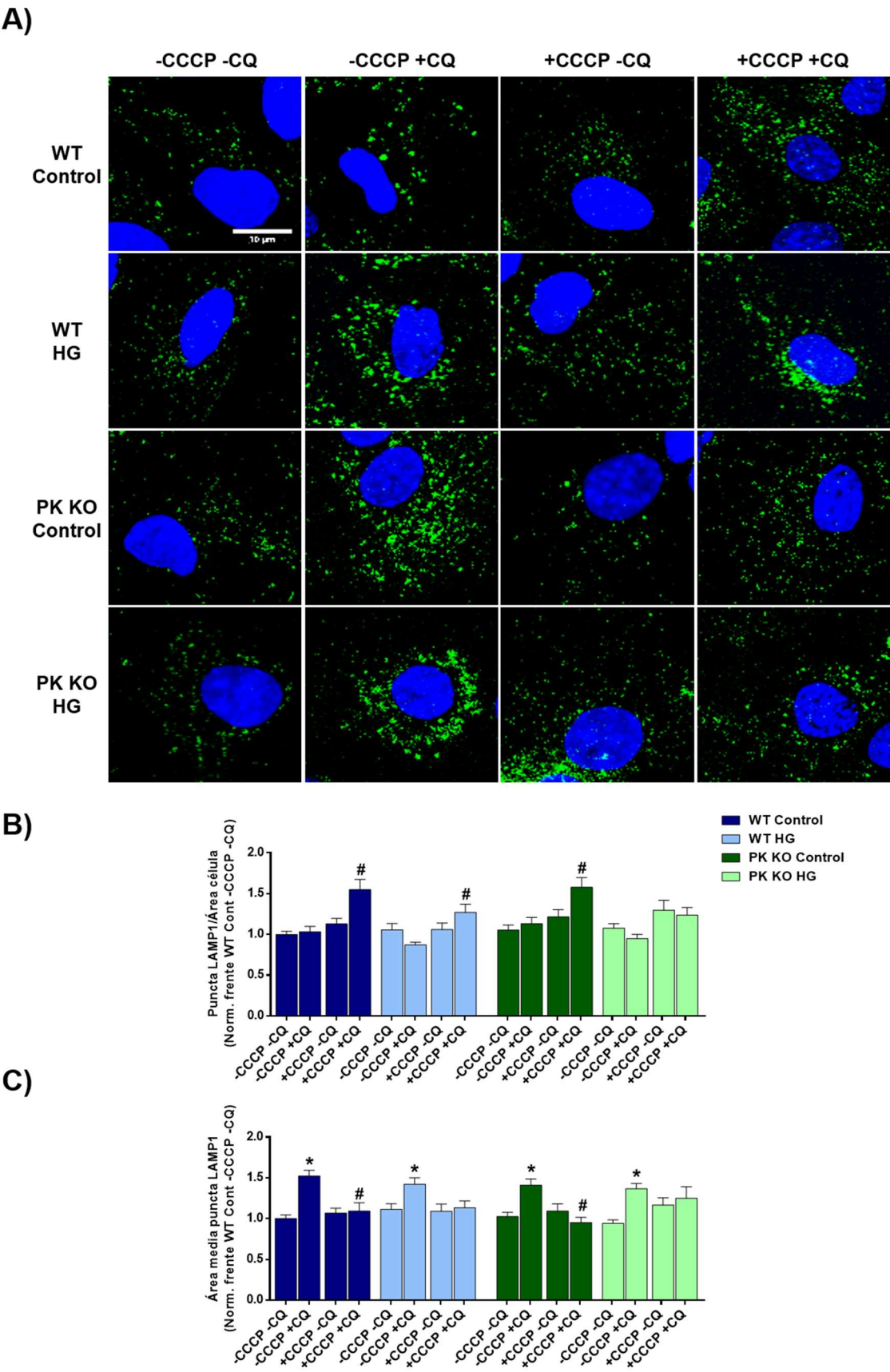


Figura 78: Inmunomarcaje para LAMP1 en astrocitos WT y PK KO. Efecto de la incubación con HG y CCCP. A) Imágenes representativas de las distintas condiciones

## Resultados

ensayadas. **B)** Cuantificación del número de “puncta” positivos para LAMP1 (lisosomas). **C)** Área media de las partículas positivas para LAMP1. n=20-40 células por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \*  $p < 0,05$  debido a la CQ. #  $p < 0,05$  debido a la adición de CCCP.

### 5.9.7. Funcionalidad mitocondrial en presencia de CCCP

A continuación, se quiso determinar si el aumento de éter lípidos era capaz de revertir algunos de los efectos observados sobre la funcionalidad mitocondrial causados por el CCCP.

La adición de HG corrigió los efectos causados por el CCCP sobre la tasa de respiración basal en astrocitos WT (figura 79; paneles A y B). Esto pudo deberse a la neutralización de ROS generadas por acción del CCCP debida al efecto antioxidante que presentan los éter lípidos.

Por otro lado, en presencia de HG la exposición a CCCP no alteró las tasas de respiración máxima o de capacidad respiratoria de reserva en astrocitos WT o PK KO (figura 79; paneles D-E). En estas condiciones estos dos parámetros seguían siendo más bajos en las células PK KO. Por último, la producción de ATP disminuyó en los dos tipos de células, revirtiendo el incremento de este parámetro debido a la acción del CCCP (figura 79; panel F).

Los efectos del HG sobre la respiración basal y la producción de ATP pudieron deberse a que en estas condiciones se impidió que se acumulase daño en las mitocondrias que no habían sido degradadas por acción del CCCP. Al haber efecto tanto en las células WT como PK KO quedó demostrado que los efectos del incremento de la síntesis de éter lípidos sobre estos dos parámetros tras la activación de mitofagia eran independientes de Parkin. Seguramente estos efectos se debieron a la acción antioxidante atribuida a esta clase lipídica.

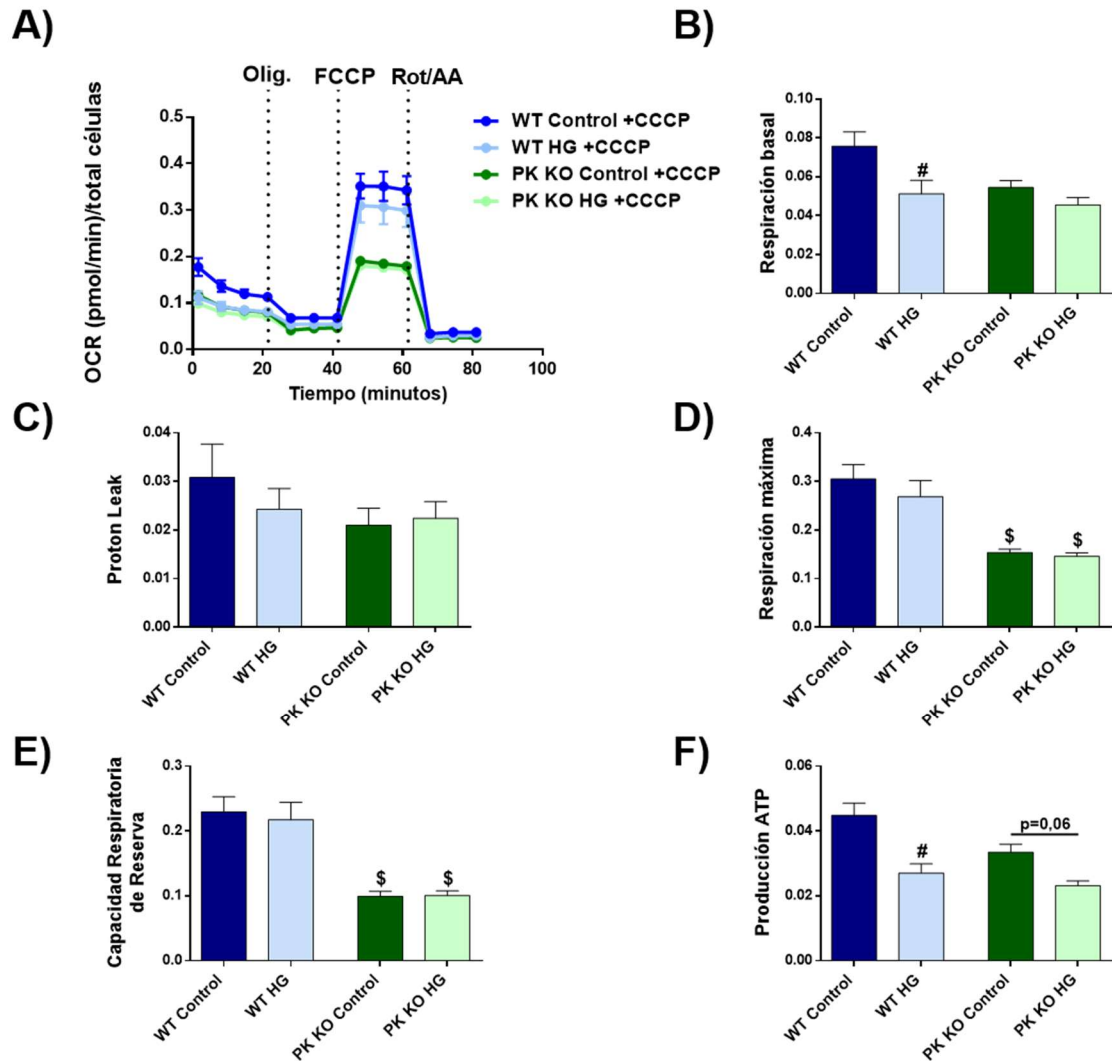
Sin embargo, las diferencias en las tasas de respiración máxima y de capacidad respiratoria de reserva podrían ir asociadas a cambios en el número total de mitocondrias y en el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria de electrones. Dado que la estimulación de la síntesis de éter lípidos no consiguió revertir las disminuciones de estos dos parámetros causados por el CCCP en astrocitos PK KO, se demostró que Parkin jugaba un papel en el mantenimiento de un conjunto de mitocondrias funcionales (debido a su implicación en procesos de mitofagia de mitocondrias dañadas) y que el incremento de éter lípidos no activaba procesos de mitofagia independientes de Parkin.

Como resumen de los efectos del HG sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO indicar que:

- La incubación con HG incrementó los niveles de éter lípidos produciendo además alteraciones en otras clases lipídicas.
- El incremento de éter lípidos aumentó la actividad autofágica en astrocitos WT tras la retirada de suero en un proceso dependiente de la proteína Parkin.

## Resultados

La incubación con HG logró revertir los efectos dañinos causados por el CCCP sobre las mitocondrias que no habían sido degradadas por mitofagia en células WT y PK KO, aunque no consiguió mejorar los efectos deletéreos observados en células PK KO y relativos al mantenimiento de un conjunto funcional de mitocondrias dependiente de procesos de mitofagia.



**Figura 79: Funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. Cambios con la suplementación con HG y la posterior inducción de daño mitocondrial.** A) Cinéticas de experimentos MitoStress Kit de Seahorse XFp en astrocitos WT y PK KO en ausencia o presencia de HG y presencia de CCCP. Se indican los tiempos a los que se inyectaron cada uno de los tres compuestos del kit. Se representan las tasas de consumo de oxígeno divididas entre el número total de células por pocillo. B) Tasas de respiración basal. C) Tasas de “proton leak”. D) Tasas de respiración máxima. E) Tasas de capacidad respiratoria de reserva. F) Tasas de producción de ATP. n=9 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey. # p<0,05 debido a la adición de CCCP. \$ p<0,05 debido a la ausencia de Parkin. & p<0,05 debido a la adición de HG.

### **5.10. Efectos de la adición de un éter lípido exógeno sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial en astrocitos. Cambios con la inducción de autofagia, de daño mitocondrial y con la eliminación de Parkin.**

Para dilucidar si los efectos del HG sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial se debían a cambios en la localización subcelular de los éter lípidos sintetizados, se llevaron a cabo experimentos con un precursor específico de la síntesis de esta clase lipídica. En este sentido, ya se ha demostrado en este trabajo que en condiciones de ayuno aumenta el porcentaje de éter lípidos en las membranas de los autofagosomas (figura 35). El lípido utilizado, eLpPC, presentaba un triple enlace en la colina (alkine-lípido) lo que permitió su trazabilidad mediante experimentos de TLC y microscopía de fluorescencia (Gaebler, Milan et al. 2013).

La suplementación con eLpPC (en las mismas condiciones que las usadas para el HG) sirvió para estudiar la captación y el metabolismo de este lípido, la localización subcelular de los éter lípidos sintetizados, los efectos sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial y los cambios inducidos en estos procesos por la eliminación de Parkin, la retirada de suero o la incubación con CCCP.

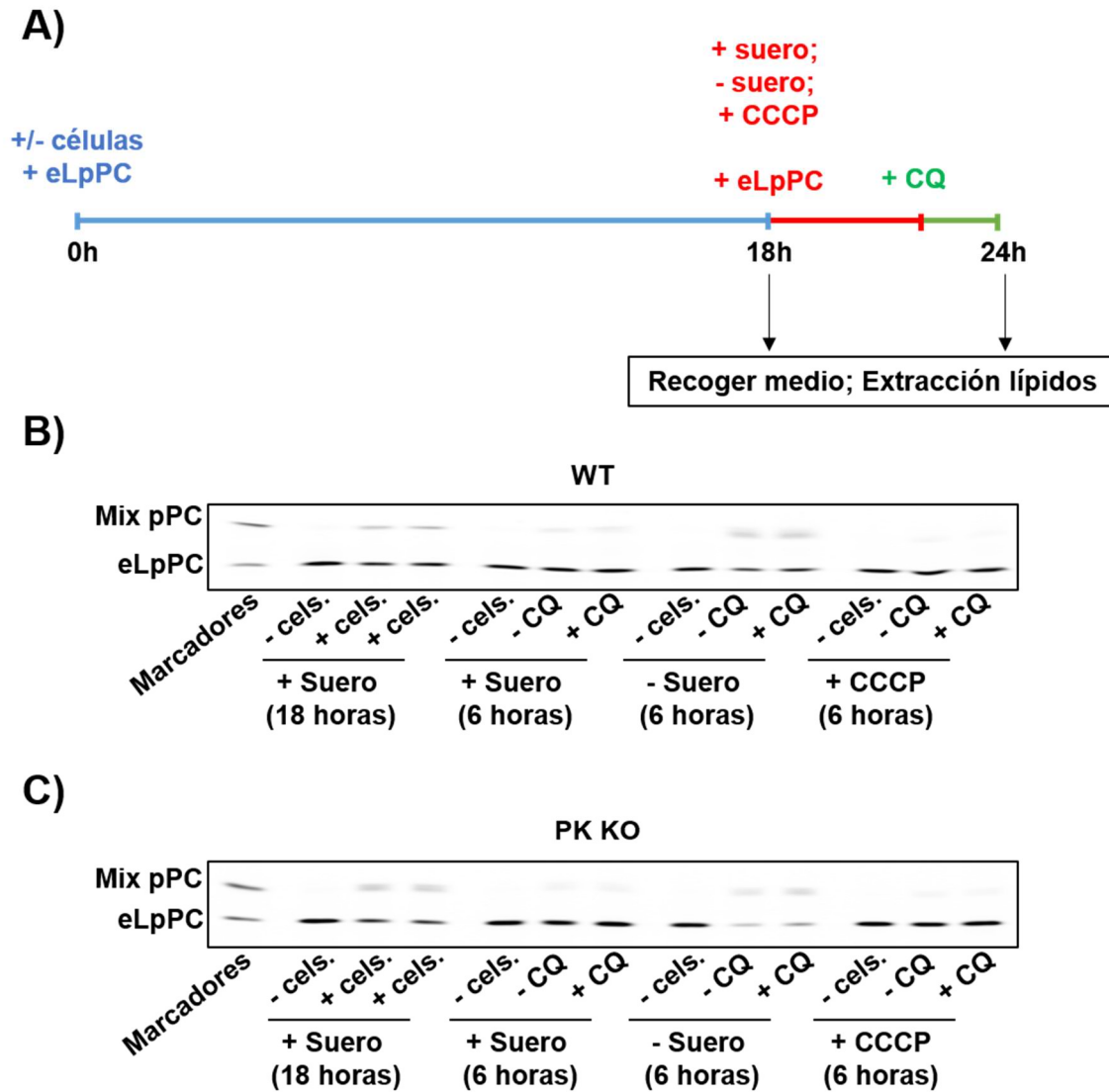
#### **5.10.1. Captación y metabolismo de eLpPC**

En primer lugar, se quiso caracterizar si los astrocitos eran capaces de captar el eLpPC añadido, metabolizarlo para formar epPC y si la ausencia de Parkin promovía algún tipo de efecto sobre estos procesos. Además, debido a que en estos experimentos se llevaron a cabo dos adiciones del lípido (una a las 0 horas de experimento y en medio con suero, y la segunda a las 18 horas y en medio con suero, sin suero o con CCCP), también se quiso estudiar el grado de captación del lípido en las primeras 18 y en las últimas 6 horas de experimento, y si esta captación se veía afectada por la retirada de suero o por la presencia de CCCP.

Se llevaron a cabo experimentos de TLC utilizando como marcadores al propio éter lípido exógeno y un mix de pPC (está demostrado que la movilidad de pPC en placas de TLC es la misma que la de epPC). En primer lugar, se muestran experimentos de TLC cargados con lípidos extraídos de los medios de cultivo incubados con astrocitos WT o PK KO.

Se muestran los distintos protocolos de incubación utilizados (figura 80; panel A). En primer lugar, y como era de esperar, los medios que no estuvieron en contacto con las células no presentaron señal para epPC (figura 80; paneles B y C). En aquellos que fueron recogidos tras 18 horas de incubación con astrocitos WT o PK KO se observó una disminución de eLpPC y se detectó señal de epPC (figura 80; paneles B y C). Esto indicaba que los astrocitos captaban el lípido del medio, lo metabolizaban y posteriormente lo secretaban.

## Resultados



**Figura 80: Niveles de eLpPC y epPC en medios de cultivo tras la incubación con astrocitos WT y PK KO.** **A)** Protocolo de incubación con eLpPC, activación de autofagia y daño mitocondrial y adición de HG. Se extrajeron lípidos de los medios de cultivo a las 18 y a las 24 horas de experimento (este último se nombra en los paneles B y C como 6 horas que fue el tiempo de incubación). **B)** Experimento de TLC de medios de cultivo en ausencia o presencia de células WT. **C)** Experimento de TLC de medios de cultivo en ausencia o presencia de células PK KO. n=2 para cada condición.

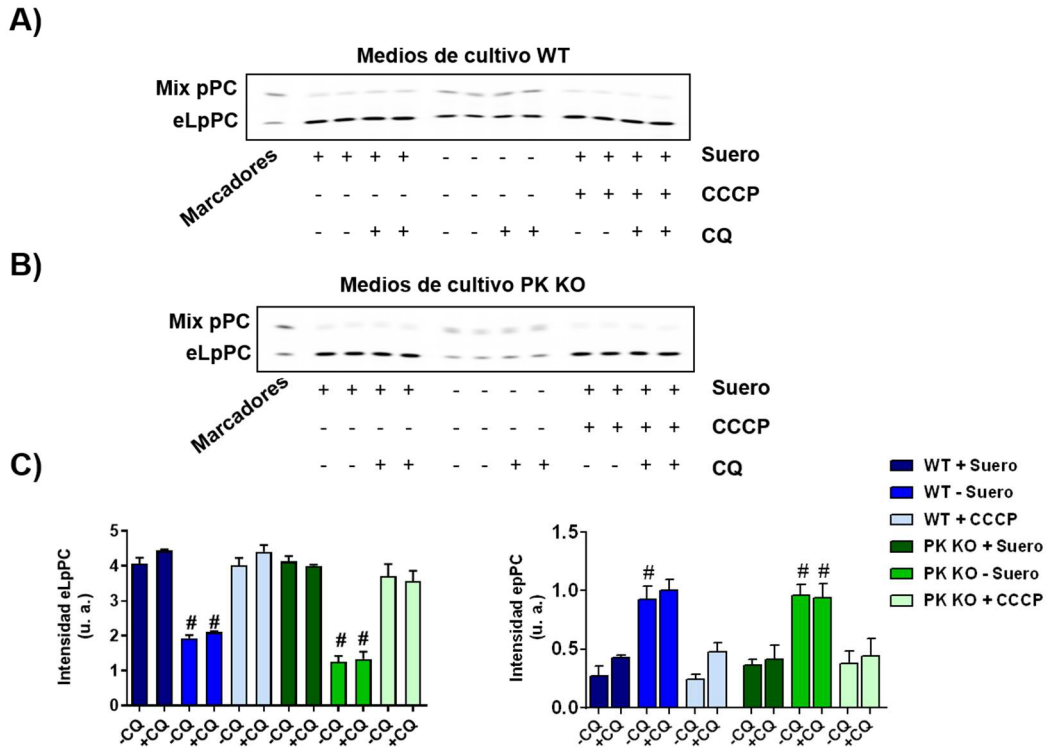
En los medios recogidos tras 6 horas de incubación (se cambió el medio a las 18 horas de experimento y se recogió a las 24 horas) en presencia de células y que contenían suero o CCCP se detectó más señal para eLpPC y menos para epPC que los medios recogidos tras las primeras 18 horas (figura 80; paneles B y C). Esto indicaba que en estas condiciones los procesos de captación de eLpPC y posterior secreción de epPC al medio de cultivo eran menores. Esta disminución en la captación de eLpPC se debió a que las células ya habían estado en presencia del lípido exógeno.

Por último, cuando se analizaron los niveles de eLpPC y epPC de medios de cultivo sin suero tras 6 horas de incubación con astrocitos WT y PK KO, se observó una disminución de eLpPC y un incremento de epPC respecto a los medios con suero o con

## Resultados

CCCP recogidos tras el mismo tiempo de incubación (figura 80; paneles B y C). Por lo tanto, la retirada de suero incrementó las tasas de captación de eLpPC y de secreción al medio de epPC por parte de astrocitos WT y PK KO.

A continuación, se estudió la captación y el metabolismo de eLpPC y la secreción de epPC, y los cambios en estos procesos debidos a la eliminación de Parkin, al ayuno, y a las adiciones de CCCP y CQ.



**Figura 81: Niveles de eLpPC y epPC en medios de cultivo tras la incubación con astrocitos WT y PK KO. Efectos de la activación de autofagia o mitofagia y el bloqueo de la degradación lisosomal. A)** Experimento de TLC de medios tras incubación con astrocitos WT. **B)** Experimento de TLC de medios tras incubación con astrocitos PK KO. **C)** Cuantificación de la intensidad de señal para eLpPC y epPC. n=4 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. # p<0,05 debido a la ausencia de suero.

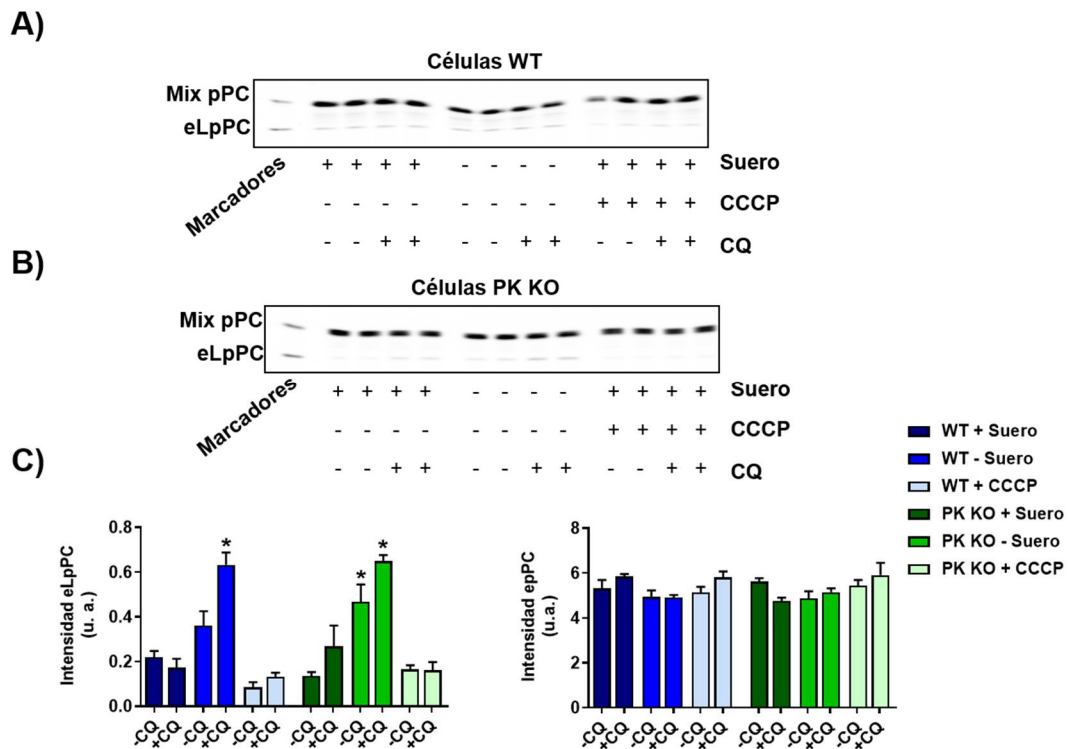
La retirada de suero incrementó las tasas de captación de eLpPC y de secreción de epPC por parte de astrocitos en cultivo (figura 81; paneles A-C). Por otro lado, no se observaron cambios en estos procesos debidos a la supresión de Parkin, al bloqueo de la degradación lisosomal o a la suplementación con CCCP (figura 81; paneles A-C).

En los astrocitos se detectó más epPC que eLpPC en todas las condiciones (al contrario de lo que ocurría en los medios de cultivo) indicando que el eLpPC captado era utilizado para la síntesis de epPC (figura 82; paneles A-B). La señal de eLpPC era mayor en condiciones de ayuno que en presencia de suero o CCCP (figura 82; paneles A-C). Sin embargo, epPC en los astrocitos WT y PK KO no se vio alterado por ninguno de los tratamientos (figura 82; paneles A-C). El incremento de eLpPC tras la retirada de suero se asoció con el incremento en los procesos de captación de este lípido observado en los experimentos de TLC llevados a cabo con lípidos extraídos de los medios de cultivo

## Resultados

(figura 81). Sin embargo, la ausencia de cambios en la señal de epPC demostró que las células sintetizaban la mayoría de este lípido a partir de eLpPC en las 18 horas previas y que la abundancia de este lípido no se veía afectada por las variaciones de la captación de eLpPC. Además, al presentar los astrocitos WT y PK KO la misma cantidad de epPC, las posibles diferencias en la actividad autofágica y la funcionalidad mitocondrial tras la incubación con el lípido exógeno no pudieron ser debidas a diferencias en los niveles de éter lípidos.

Estos experimentos demostraron que los astrocitos eran capaces de captar éter lípidos exógenos y metabolizarlos para formar epPC y secretar parte del epPC producido al medio en un proceso independiente de Parkin. Por otro lado, el ayuno incrementó la captación de eLpPC y la secreción de epPC.



**Figura 82: Niveles de eLpPC y epPC en astrocitos WT y PK KO. Efectos de la activación de autofagia o mitofagia y el bloqueo de la degradación lisosomal.** A) Experimento de TLC de astrocitos WT. B) Experimento de TLC de astrocitos PK KO. C) Cuantificación de la intensidad de señal para eLpPC y epPC en cada una de las condiciones ensayadas. n=4 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. # p<0,05 debido a la ausencia de suero.

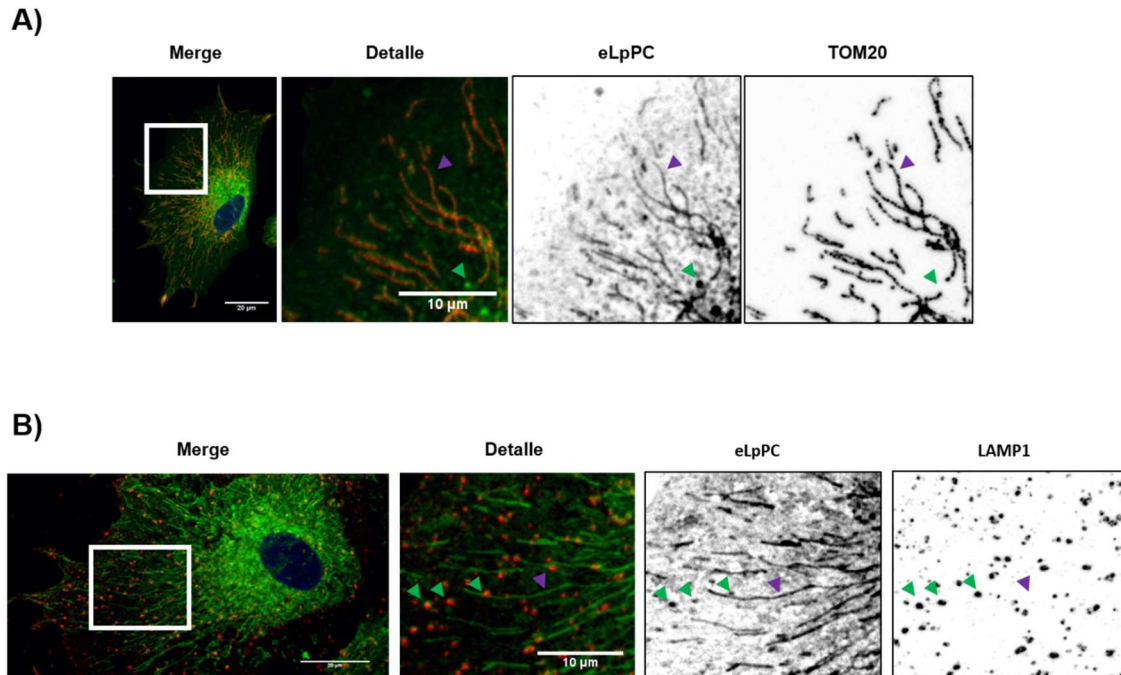
### 5.10.2. Localización subcelular del éter lípido exógeno

A continuación, se quiso estudiar si los efectos sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial producidos por el aumento de éter lípidos se debían a cambios en la localización subcelular de esta clase lipídica. Para ello, se aprovechó el enlace alkino presente en los éter lípidos exógenos y en sus productos de metabolismo. eLpPC es capaz



## Resultados

de conjugarse a reporteros azido-coumarin fluorescentes permitiendo su detección en experimentos de inmunofluorescencia. Además del marcaje de los lípidos exógenos, se utilizaron anticuerpos específicos frente a mitocondrias, lisosomas y autofagosomas (TOM20 [Translocase of the Outer Mitochondrial membrane 20], LAMP1 y LC3 respectivamente) con el fin de determinar los posibles cambios de localización subcelular del lípido debidos al ayuno, a la retirada de suero y a la adición de CCCP.



**Figura 83: Inmunomarcaje para eLpPC, TOM20 y LAMP1 en astrocitos WT en condiciones basales. A)** Co-marcaje de eLpPC (verde) y TOM20 (rojo) en astrocitos WT. **B)** Co-marcaje de eLpPC (verde) y LAMP1 (rojo) en astrocitos WT. Puntas de flecha moradas: Marcaje “fibrilar” de eLpPC. Puntas de flecha verdes: Marcaje “punteado” de eLpPC.

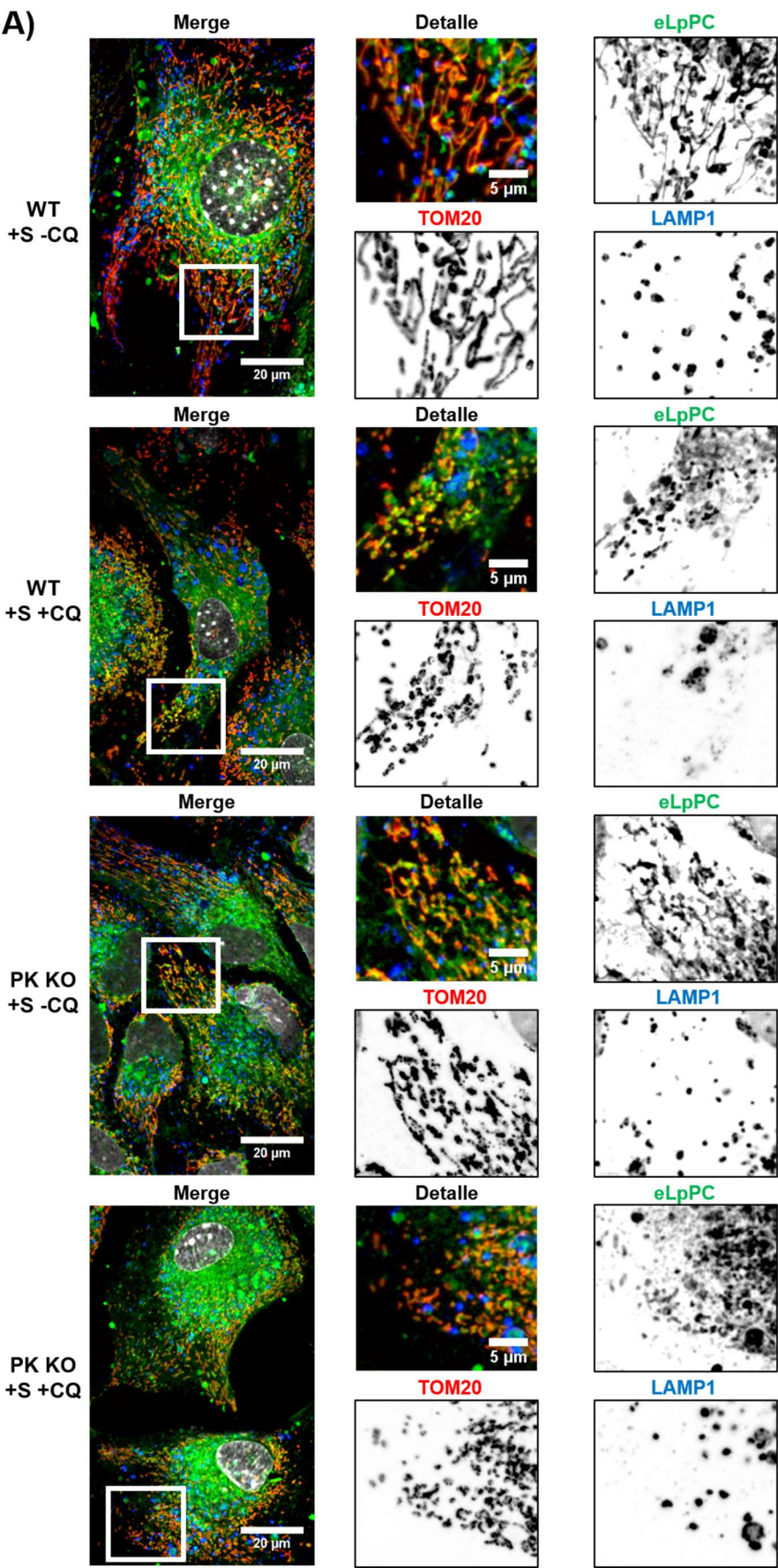
En condiciones basales el lípido exógeno presentó, en su mayor parte, un marcaje “fibrilar” que colocalizó con la proteína mitocondrial TOM20, aunque también se detectó marcaje “punteado” de eLpPC colocalizando con la proteína de la membrana lisosomal LAMP1 (figura 83; paneles A-B). Las células PK KO mostraron el mismo tipo de patrón de marcaje de eLpPC en estas condiciones (datos no mostrados). Estos resultados demostraron que el éter lípido incorporado a los astrocitos en cultivo se encontraba preferentemente en las mitocondrias.

La localización mitocondrial de éter lípidos exógenos añadidos a células en cultivo ya había sido demostrada previamente, aunque utilizando un tipo diferente de lípido (polyene-lipids) (Kuerschner, Richter et al. 2012). Por otro lado, la localización lisosomal del éter lípido pudo deberse a la transferencia de lípidos entre las membranas de distintos orgánulos subcelulares o a la degradación de mitocondrias en los lisosomas.

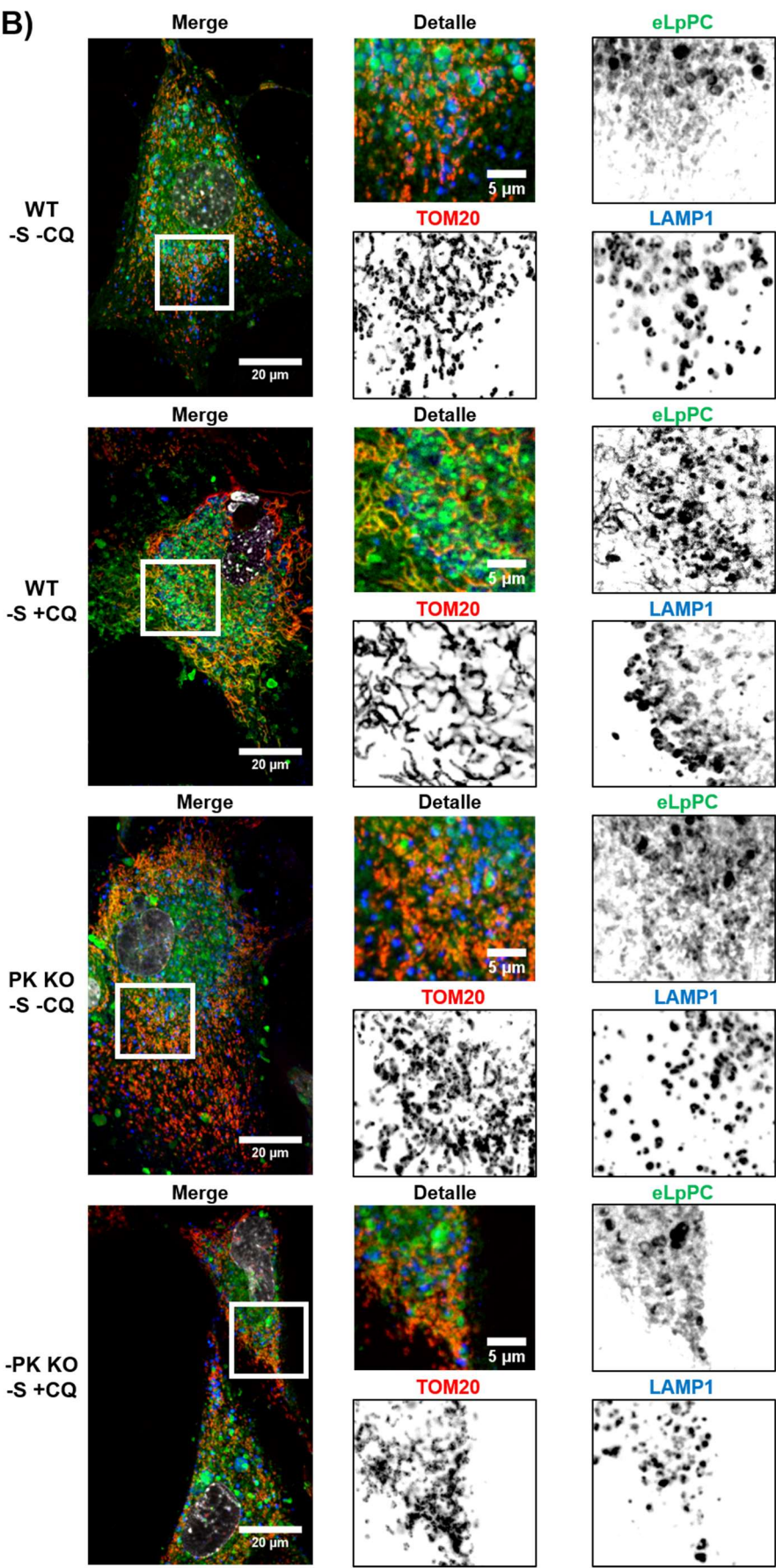
El siguiente paso consistió en la caracterización de las posibles variaciones de la localización subcelular de los éter lípidos en astrocitos WT y PK KO promovidos por la retirada de suero, la suplementación con CCCP y el bloqueo de la degradación lisosomal.



Resultados

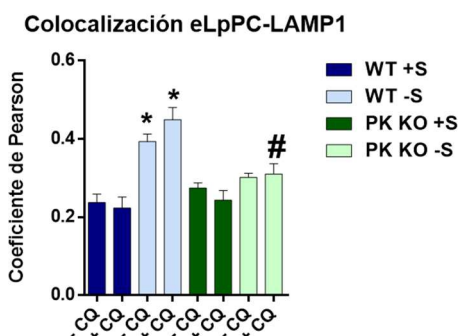


Resultados



## Resultados

C)



**Figura 84: Localización subcelular de eLpPC en astrocitos WT y PK KO en presencia y en ausencia de suero. A)** Imágenes representativas de astrocitos inmunomarcados frente a eLpPC (verde), TOM20 (rojo) y LAMP1 (azul) en presencia de suero. En gris se muestran los núcleos. **B)** Imágenes representativas de astrocitos inmunomarcados frente a eLpPC (verde), TOM20 (rojo) y LAMP1 (azul) en ausencia de suero. En gris se muestran los núcleos. **C)** Cuantificación del grado de colocalización (Coeficiente de Pearson) entre eLpPC y LAMP1. n=15-20 células por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey. \*p<0,05 debido a la adición de CQ. #p<0,05 debido a la delección de Parkin.

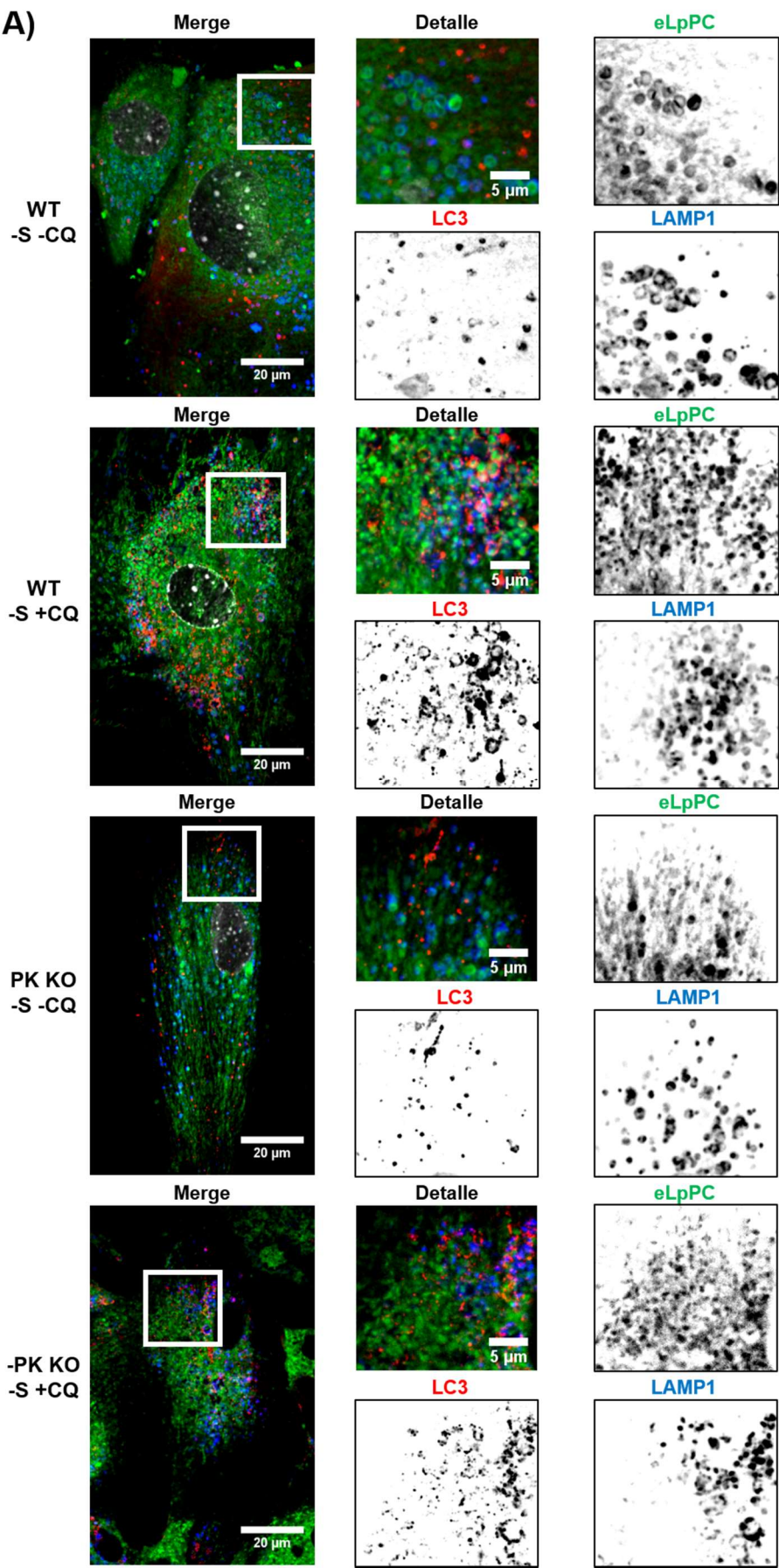
En presencia de suero, el eLpPC captado y metabolizado por los astrocitos WT y PK KO en cultivo presentó un marcaje fibrilar que co-localizó con el marcador mitocondrial TOM20 indicando que el lípido exógeno se localizaba preferentemente en las mitocondrias (figura 84; panel A). Además, el bloqueo de la degradación lisosomal no alteró la localización subcelular de los éter lípidos. La localización mitocondrial de los éter lípidos exógenos podría estar relacionada con la función antioxidante atribuida a esta clase lipídica.

En ausencia de suero, el eLpPC presentó preferentemente un marcaje puntuado que co-localizó con el marcador lisosomal LAMP1 (figura 84; panel B), aunque también se observó marcaje de eLpPC co-localizando con TOM20. Las células PK KO tenían un menor coeficiente de co-localización entre eLpPC y LAMP1 indicando una menor presencia de eLpPC en las membranas de los lisosomas (figura 84; panel C). La co-localización de eLpPC y LAMP1 indicó que el lípido exógeno llegaba a los lisosomas en condiciones de activación de autofagia. Además, la ausencia de triple co-localización entre eLpPC-LAMP1-TOM20 demostró que el lípido exógeno no llegaba a los lisosomas formando parte de las membranas de mitocondrias dañadas que eran degradadas mediante mitofagia. Por lo tanto, los resultados obtenidos apuntaban a la transferencia de membranas entre las mitocondrias y los lisosomas, o entre las mitocondrias y los autofagosomas y la posterior fusión entre estos últimos y los lisosomas. La menor proporción de eLpPC con marcaje puntuado y co-localizando con LAMP1 en células PK KO pudo deberse a alteraciones en los procesos de transferencia de membrana responsables de la llegada de eLpPC a los lisosomas.

Con el fin de determinar si la transferencia de eLpPC a los lisosomas se producía por su incorporación a las membranas de los autofagosomas y la posterior fusión de las membranas de estos orgánulos con la de los lisosomas, se analizó la posible co-localización de eLpPC con LC3 en condiciones de ayuno en astrocitos WT y PK KO.

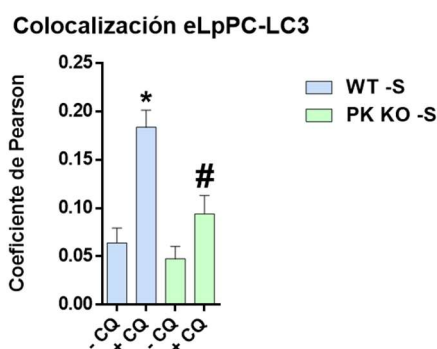


Resultados



## Resultados

B)



**Figura 85: Localización subcelular de eLpPC en astrocitos WT y PK KO en condiciones de ayuno. Co-marcaje con LC3. A)** Imágenes representativas de astrocitos inmunomarcados frente a eLpPC (verde), LC3 (rojo) y LAMP1 (azul). En gris se muestran los núcleos. **B)** Cuantificación del grado de colocalización (Coeficiente de Pearson) entre eLpPC y LC3 en ausencia de suero. n=15-20 células por condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey. \*p<0,05 debido a la adición de CQ. # p<0,05 debido a la ausencia de Parkin.

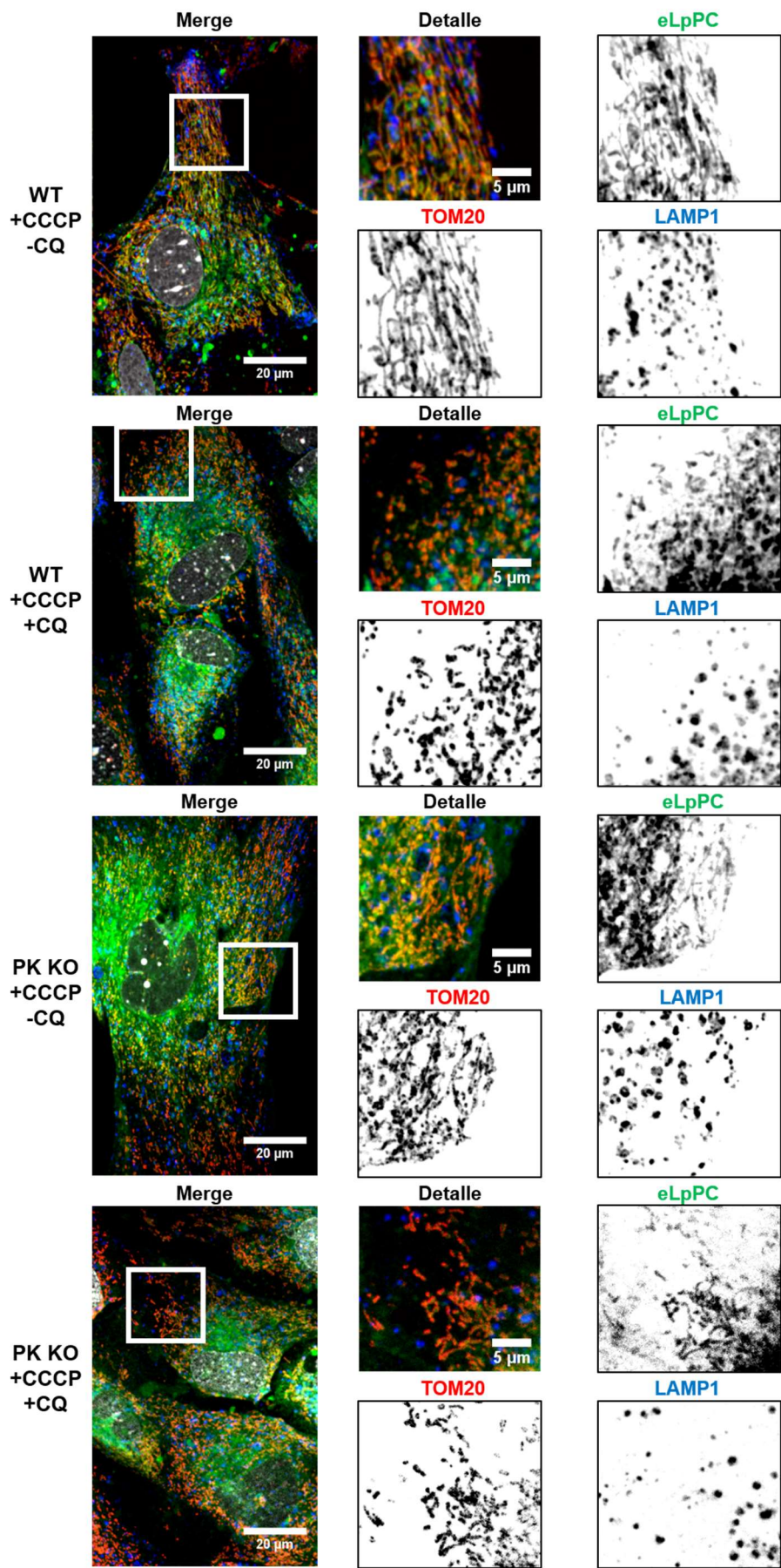
En presencia de CQ el lípido exógeno co-localizó con LC3 en células WT, mientras que dicha colocalización era mucho menor en los astrocitos PK KO (figura 85; paneles A y B). La adición de CQ produjo una acumulación de autofagosomas que permitió detectar la señal de eLpPC en estos orgánulos. En ausencia de CQ no se observó una acumulación de autofagosomas, lo que indicó que la incorporación de eLpPC a las membranas de estos orgánulos no afectaba a los procesos de fusión de membranas con los lisosomas (figura 85; paneles A y B). Las diferencias observadas entre las células WT y PK KO pudieron deberse a la implicación de la proteína Parkin en los procesos de transferencia de membrana entre las mitocondrias y los autofagosomas. Estos resultados no descartan que existan otras rutas alternativas de llegada de eLpPC a las membranas de los lisosomas (transferencia directa de membranas entre mitocondrias y lisosomas, o llegada de material a los lisosomas mediante “Mitochondrial Derived Vesicles”) (Sugiura, McLelland et al. 2014).

Por otro lado, la transferencia de eLpPC a los autofagosomas en ausencia de suero, mediante un proceso dependiente de Parkin, explicaría los cambios en la actividad autofágica observados en estas condiciones en presencia de HG (figuras 69-72). El aumento de la síntesis de éter lípidos promovida por el HG y la posterior transferencia de esta clase lipídica a los autofagosomas explicaría este incremento de la actividad autofágica (figura 69-72).

Por último, se analizó la localización subcelular de los éter lípidos exógenos en condiciones de daño mitocondrial.

En presencia de CCCP, los éter lípidos exógenos presentaron un marcaje fibrilar co-localizando con el marcador mitocondrial TOM20 en astrocitos WT y PK KO (figura 86) indicando que el daño mitocondrial no alteraba la localización subcelular de los éter lípidos exógenos. En estas condiciones, no se observó marcaje de eLpPC en los lisosomas, lo que demostró que no se producían procesos de transferencia de estos lípidos entre orgánulos subcelulares. La localización mitocondrial de los éter lípidos exógenos

Resultados



## Resultados

**Figura 86: Localización subcelular de eLpPC en astrocitos WT y PK KO en presencia de CCCP.** Imágenes respresentativas de astrocitos inmunomarcados frente a eLpPC (verde), TOM20 (rojo) y LAMP1 (azul). En gris se muestran los núcleos. n=15-20 células por condición.

en presencia de CCCP explicaría los efectos observados en la funcionalidad mitocondrial en presencia de HG (figura 79). El incremento de la síntesis de éter lípidos revertía algunos de los efectos dañinos causados por el CCCP debido al incremento de los niveles de esta clase lipídica en las membranas mitocondriales.

Por lo tanto, y como resumen de los experimentos de inmunofluorescencia llevados a cabo utilizando reporteros fluorescentes que se conjugaban a eLpPC y anticuerpos frente a marcadores de distintos orgánulos subcelulares (mitocondrias, autofagosomas y lisosomas) se pudo demostrar que:

- En condiciones basales los éter lípidos exógenos se localizaban preferentemente en las membranas de las mitocondrias aunque también se detectó señal de eLpPC en los lisosomas.
- La activación de autofagia mediante retirada de suero alteró la localización subcelular de los éter lípidos exógenos. En estas condiciones, eLpPC presentaba preferentemente un patrón punteado que co-localizaba con LAMP1 y LC3 en células WT. En células PK KO, aunque también se observó eLpPC con patrón punteado, la mayoría del éter lípido permanecía en las membranas mitocondriales. Este hecho demostró la transferencia de éter lípidos de las membranas de las mitocondrias a las de los autofagosomas y la posterior transferencia a los lisosomas mediante la fusión de membranas entre estos dos orgánulos. La transferencia de eLpPC de las mitocondrias a los autofagosomas dependía de la proteína Parkin.
- La adición de HG no alteró la localización subcelular de los éter lípidos exógenos en astrocitos en cultivo. En estas condiciones eLpPC se localizaba en las mitocondrias y no se detectó este lípido ni en lisosomas ni en autofagosomas.

### 5.10.3. Actividad mitocondrial

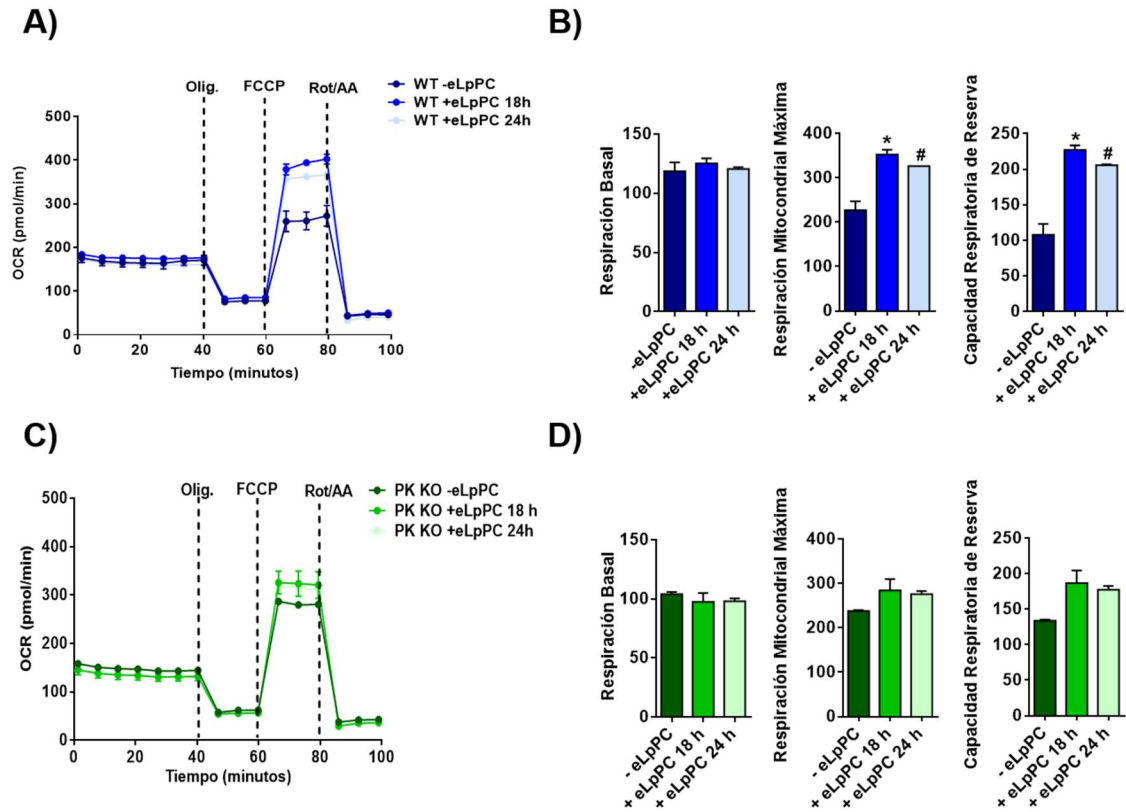
Para determinar el efecto de la suplementación con eLpPC sobre la actividad mitocondrial y las posibles alteraciones debidas al cambio de localización subcelular se llevaron a cabo experimentos de Seahorse XFe.

Además de los protocolos de incubación usados en los experimentos de TLC y de inmunofluorescencia (incubación con eLpPC durante 24 horas con dos adiciones del lípido a las 0 y a las 18 horas de experimento), en este apartado se siguió un protocolo de suplementación con eLpPC solo durante las primeras 18 horas de experimento (las últimas 6 horas fueron en ausencia de lípido exógeno).

Mediante estos experimentos se pudieron comparar los efectos de la adición de eLpPC en presencia o ausencia de suero y en presencia de CCCP sobre las tasas de respiración basal, respiración máxima y capacidad respiratoria de reserva.



## Resultados



**Figura 87: Efectos de la adición de eLpPC en presencia de suero sobre la funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO.** **A)** Cinéticas de la tasa de consumo de oxígeno en astrocitos WT y los cambios inducidos por la incubación con eLpPC durante 18 ó 24 horas. Se indican los tiempos a los que se inyectaron las tres drogas del kit. **B)** Tasas de respiración basal, de respiración mitocondrial máxima y de capacidad respiratoria de reserva en astrocitos WT. **C)** Cinéticas de la tasa de consumo de oxígeno en astrocitos PK KO y los cambios inducidos por la incubación con eLpPC durante 18 ó 24 horas. Se indican los tiempos a los que se inyectaron las tres drogas del kit. **D)** Tasas de respiración basal, de respiración mitocondrial máxima y de capacidad respiratoria de reserva en astrocitos PK KO. n=4 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \*p<0,05 debido a la incubación durante 18 horas con eLpPC. #p<0,05 debido a la incubación durante 24 horas con eLpPC.

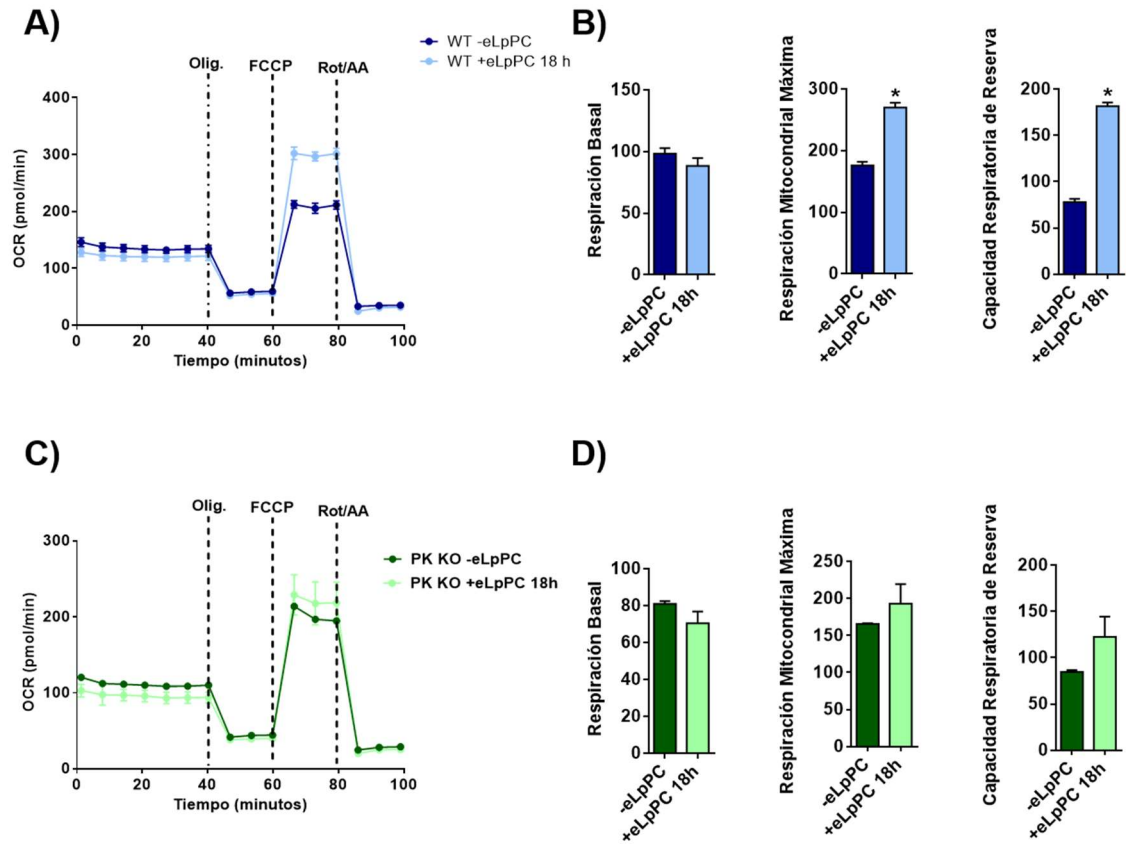
La presencia de eLpPC en condiciones basales no alteró la tasa de respiración basal de astrocitos WT o PK KO (figura 87; paneles B y D). Sin embargo, el incremento de los niveles de éter lípidos aumentó las tasas de respiración máxima y de capacidad respiratoria de reserva en células WT (figura 87; panel B). En estas células no existieron diferencias en estos dos parámetros entre los dos protocolos de incubación con eLpPC, lo que pudo deberse a que en las últimas 6 horas de experimento disminuía la captación de eLpPC del medio (figura 80) y que los niveles de eLpPC en las células no variaban (figura 82).

Estos resultados demostraron que la incubación con eLpPC y la consiguiente estimulación selectiva de la síntesis de éter lípidos incrementaban la funcionalidad mitocondrial en astrocitos en cultivo en un proceso dependiente de la proteína Parkin.



## Resultados

A continuación, se analizaron los efectos sobre la funcionalidad mitocondrial de la incubación con eLpPC durante 18 horas y la posterior activación de autofagia.

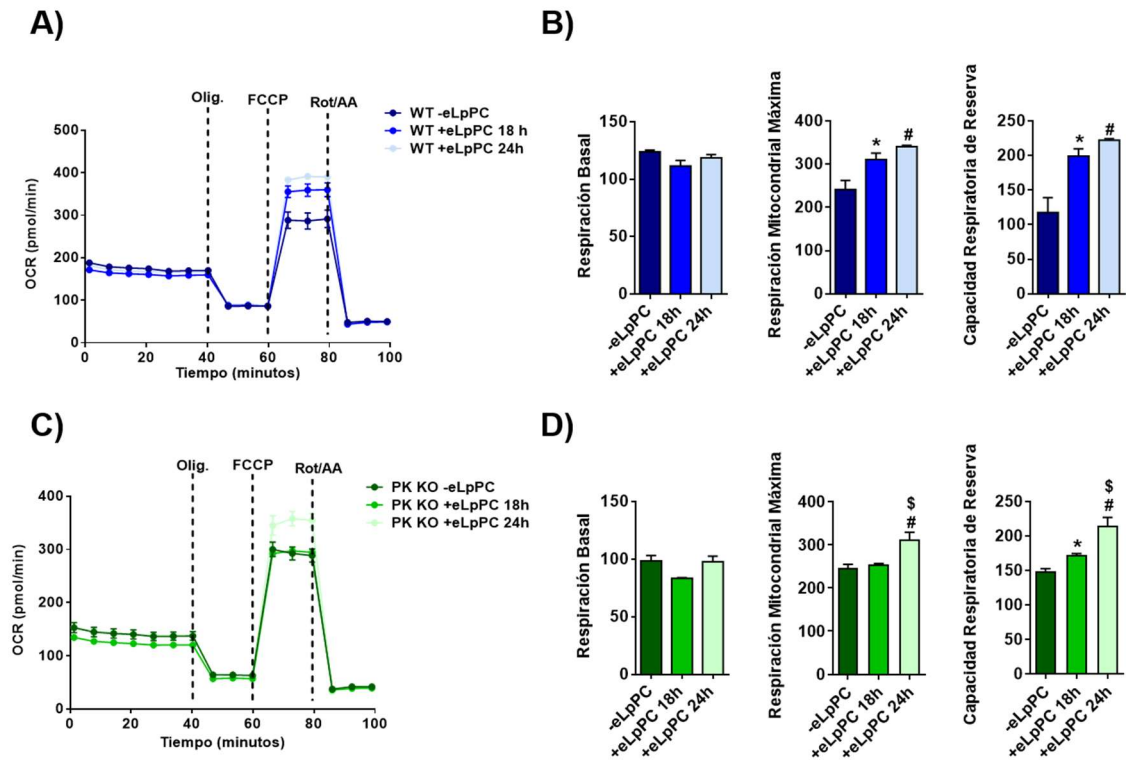


**Figura 88: Efectos de la suplementación con eLpPC y la posterior retirada de suero sobre la funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO.** A) Cinéticas de la tasa de consumo de oxígeno en astrocitos WT en ausencia de suero y los cambios inducidos por la incubación con eLpPC durante 18 horas. Se indican los tiempos a los que se inyectaron las tres drogas del kit. B) Cuantificación de las tasas de respiración basal, de respiración mitocondrial máxima y de capacidad respiratoria de reserva en células WT. C) Cinéticas de la tasa de consumo de oxígeno en astrocitos PK KO en ausencia de suero y los cambios inducidos por la incubación con eLpPC durante 18 horas. Se indican los tiempos a los que se inyectaron las tres drogas del kit. D) Cuantificación de las tasas de respiración basal, de respiración mitocondrial máxima y de capacidad respiratoria de reserva en células PK KO. n=4 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \*p<0,05 debido a la incubación durante 18 horas con eLpPC.

La activación de autofagia tras la incubación con eLpPC no alteró la tasa de respiración basal de astrocitos en cultivo (figura 88; paneles B y D). En cambio, en células WT aumentaron las tasas de respiración máxima y de capacidad respiratoria de reserva (figura 88; panel B). Estos efectos eran los mismos que los observados en presencia de suero (figura 87) indicando que en condiciones de ayuno los éter lípidos producidos modulaban la actividad mitocondrial aunque la mayoría de estos lípidos se habían movilizado a las membranas de los autofagosomas y los lisosomas.

Por último, se estudió el efecto de la adición de eLpPC en condiciones de daño mitocondrial.

## Resultados



**Figura 89: Efectos de la adición de eLpPC en presencia de CCCP sobre la funcionalidad mitocondrial en astrocitos WT y PK KO.** A) Cinéticas de la tasa de consumo de oxígeno en astrocitos WT y los cambios inducidos por la incubación con eLpPC durante 18 ó 24 horas. Se indican los tiempos a los que se inyectaron las tres drogas del kit. B) Cuantificación de las tasas de respiración basal, de respiración mitocondrial máxima y de capacidad respiratoria de reserva en células WT. C) Cinéticas de la tasa de consumo de oxígeno en astrocitos PK KO y los cambios inducidos por la incubación con eLpPC durante 18 ó 24 horas. Se indican los tiempos a los que se inyectaron las tres drogas del kit. D) Cuantificación de las tasas de respiración basal, de respiración mitocondrial máxima y de capacidad respiratoria de reserva en células PK KO. n=4 para cada condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y análisis Tukey posterior. \*p<0,05 debido a la incubación durante 18 horas con eLpPC. # p<0,05 debido a la incubación durante 24 horas. \$ p<0,05 entre las incubaciones con eLpPC durante 18 y 24 horas.

La incubación con eLpPC en presencia de CCCP no alteró la tasa de respiración basal en astrocitos WT o PK KO (figura 89; paneles B y D). Sin embargo, el incremento de los niveles de éter lípidos aumentó las tasas de respiración máxima y de capacidad respiratoria de reserva.

En los astrocitos WT la suplementación con eLpPC durante 18 y 24 horas incrementó la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva (figura 89; paneles A y B). Por otro lado, en los astrocitos PK KO se produjeron aumentos de estos dos parámetros solo cuando se co-incubaban eLpPC y CCCP (figura 89; paneles C y D).

En las células WT los incrementos se asociaron a la localización mitocondrial de los lípidos exógenos en estas condiciones. Los éter lípidos, debido a su acción antioxidante, protegían a las mitocondrias de la producción de ROS causada por el CCCP, incrementando la actividad mitocondrial en estas células.

## Resultados

Sin embargo, en los astrocitos PK KO solo se produjo esta protección de las mitocondrias cuando se promovía el daño mitocondrial en presencia de eLpPC. Se desconocen las causas que promovieron distintos efectos de la incubación con eLpPC durante 18 ó 24 horas sobre la funcionalidad mitocondrial en estas células.

Los experimentos de Seahorse XFe demostraron que el incremento de los niveles de éter lípidos debido a la adición de eLpPC aumentó la funcionalidad mitocondrial de astrocitos en cultivo mediante procesos dependientes de la proteína Parkin.

La presencia de eLpPC no alteró las tasas de respiración basal de los astrocitos en ninguna de las condiciones ensayadas, mientras que los cambios producidos se observaron tras la inyección de los distintos compuestos del Mito Stress Kit. La estimulación de la síntesis de éter lípidos incrementó la funcionalidad mitocondrial en los astrocitos WT tanto en aquellas condiciones en las que los éter lípidos se localizaban en la mitocondria (presencia de suero y daño mitocondrial), como en aquellas en las que estos lípidos se translocaban a los autofagosomas y a los lisosomas (ayuno).

Los procesos que promovieron estos incrementos de la funcionalidad mitocondrial eran dependientes de la proteína Parkin. En las células PK KO no se observaron alteraciones debidas a la incubación con eLpPC a pesar de que estas células captaban y metabolizaban los éter lípidos exógenos (figura 82), y que los lípidos producidos se localizaban en la mitocondria (figura 84). En estas células, aumentó la funcionalidad mitocondrial cuando se incubaba con CCCP en presencia de eLpPC apuntando a la activación de procesos independientes de Parkin en estas condiciones.

## **VI – Discusión**



### VI – Discusión

En el presente trabajo se aislaron orgánulos subcelulares con el fin de analizar la composición lipídica de sus membranas y las modificaciones con la activación de autofagia, el envejecimiento y la eliminación de Parkin. El análisis lipidómico de los autofagosomas y las mitocondrias de ratones WT y PK KO permitió detectar alteraciones de distintas clases y especies lipídicas.

En algunos de estos grupos, PE y PS, se correlacionaron los cambios con modificaciones de enzimas remodeladoras de fosfolípidos. Por otro lado, en otras especies lipídicas, como los lisofosfolípidos y las Cer, se observaron distintos cambios entre autofagosomas y mitocondrias debidos al envejecimiento o a la ausencia de Parkin, indicando una regulación orgánulo dependiente. Por último, se observaron variaciones en éter lípidos tanto en las membranas de los autofagosomas como de las mitocondrias en las diferentes condiciones ensayadas.

Con el fin de profundizar en los cambios lipídicos observados y tratar de modular la autofagia y la funcionalidad mitocondrial en el modelo de ratón PK KO, se analizó el efecto de la estimulación de la síntesis de éter lípidos en astrocitos en cultivo. Mediante esta aproximación, se demostró que el aumento de esta clase lipídica era capaz de regular la autofagia y la actividad mitocondrial mediante procesos que dependían de la proteína Parkin. Además, mediante el empleo del alkenil lípido eLpPC, se demostró que los distintos efectos producidos por el aumento de éter lípidos en astrocitos podrían deberse a cambios de localización subcelular de estos lípidos.

#### 6.1. Fraccionamiento subcelular y enriquecimiento de autofagosomas

Los estudios en los que se analizan características moleculares y funcionales (composición lipídica, proteómica, estudios de actividades enzimáticas, etc...) de orgánulos subcelulares requieren como paso previo y crítico el aislamiento de la fracción subcelular en cuestión. Un protocolo de aislamiento debe lograr separar fracciones con altos grados de enriquecimiento (minimizando la contaminación con otros orgánulos subcelulares) y, además, conseguir que éstos mantengan su estructura y su función.

Los protocolos de fraccionamiento subcelular más utilizados son aquellos que se basan en la separación por ultracentrifugación en gradientes de densidad. Este gradiente puede formarse con distintos compuestos (Metrizamida, Nycodenz, Percoll, Ficoll) y separa las fracciones subcelulares en función de su densidad. Dentro de este tipo de protocolos, existen diferencias en cuanto a los orgánulos que se aíslan, el grado de enriquecimiento y el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de los mismos.

En este trabajo, se utilizó un protocolo basado en el método publicado por Marzella, L., et al (Marzella, Ahlberg et al. 1982). En este artículo se aislaron

## Discusión

autofagosomas y otros orgánulos subcelulares (autofagolisosomas, lisosomas y mitocondrias) a partir de hígados de rata. El aislamiento de las distintas fracciones se logró mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad.

Este protocolo ha sido ampliamente utilizado tanto en trabajos centrados en caracterizar mecanismos moleculares de los distintos tipos de autofagia (Surmacz, Poso et al. 1987, Dunn 1990, Ogier-Denis, Bauvy et al. 2000, Kaushik and Cuervo 2009, Raben, Shea et al. 2009, Fregno and Molinari 2018), como artículos en los que se analizaron relaciones entre lípidos y autofagia (Singh, Kaushik et al. 2009, Filimonenko, Isakson et al. 2010, Koga, Kaushik et al. 2010, Sridhar, Patel et al. 2013, Barbero-Camps, Roca-Agujetas et al. 2018) o entre la autofagia y distintas enfermedades neurodegenerativas (Yu, Cuervo et al. 2005, Jeong, Then et al. 2009, Wang, Martinez-Vicente et al. 2009, Lee, Yu et al. 2010, Martinez-Vicente, Talloczy et al. 2010). Para finalizar con los artículos que utilizan este protocolo, indicar que también se ha utilizado en trabajos centrados en la relación de autofagia y mitocondria (Huth, Rolle et al. 2002) y la proteína Parkin (Lonskaya, Hebron et al. 2013).

En este trabajo se aislaron fracciones a partir de hígados (como se describió en el artículo de 1982), pero también de cerebros de ratón. El aislamiento a partir de hígados permitió obtener fracciones de autofagosomas, autofagolisosomas, lisosomas y mitocondrias con un alto grado de enriquecimiento y con muy bajas tasas de contaminación con otros orgánulos subcelulares. El análisis de la composición lipídica de mitocondrias permitió detectar niveles de CL (lípidos utilizados para determinar el grado de pureza de este orgánulo) similares a los obtenidos en otros trabajos (Kiebish, Han et al. 2008, Pollard, Ortori et al. 2017).

En el caso del aislamiento a partir de cerebros, se lograron fracciones muy enriquecidas en lisosomas y mitocondrias. Sin embargo, el aislamiento de autofagosomas no produjo un enriquecimiento tan alto como en el caso de los hígados, lo que imposibilitó usar esta fracción para el análisis lipídico posterior. Se intentó, sin éxito, incrementar este enriquecimiento llevando a cabo algunas modificaciones en el protocolo de aislamiento.

Además de los protocolos basados en gradientes de densidad, en la actualidad existen otros métodos que permiten el aislamiento de autofagosomas a partir de distintos tejidos y células (Gao, Kang et al. 2010, Chen, Li et al. 2015). En este sentido, recientemente se ha publicado el aislamiento de estos orgánulos a partir de distintos tejidos de ratón, incluyendo el cerebro, mediante inmunoaislamiento (Yao, Qiu et al. 2018). Los autofagosomas se aislaron a partir de un modelo de ratón transgénico que presentaba la proteína fluorescente verde (GFP) unida a LC3. La separación de los autofagosomas se logró mediante la incubación con “microbeads” magnéticos recubiertos con anticuerpos frente a GFP, y la posterior separación cromatográfica en presencia de un separador magnético. Aunque este protocolo rindió fracciones de autofagosomas de cerebro enriquecidas, la necesidad de disponer del modelo de ratón GFP-LC3 imposibilitó que pudiera adoptarse. Además, GFP-LC3 a menudo provoca su agregación y su incorporación a agregados proteicos, lo que hace este modelo poco adecuado para estudiar alteraciones en enfermedades de agregación proteica como las neurodegenerativas (Kuma, Matsui et al. 2007). Por otro lado, aunque LC3-II marca principalmente autofagosomas, recientemente se ha descrito su asociación con membranas de fagosomas,

## Discusión

que tienen diferente flotabilidad en gradiente, pero que inmunoprecipitarían con este protocolo (Heckmann and Green 2019).

En el caso del aislamiento de las mitocondrias, también se han descritos otros protocolos distintos al utilizado en este trabajo. Éstos se basan en el empleo de “microbeads” magnéticos, similares a los que se han utilizado en el caso de autofagosomas, para la obtención de mitocondrias (Khattar, Yablonska et al. 2016, Liao, Boldogh et al. 2018). Además, el aislamiento de estos orgánulos a partir de células en cultivo se puede lograr utilizando procesos de cavitación seguidos por un protocolo similar al que nosotros utilizamos en hígado (Wettmarshausen and Perocchi 2017).

### **6.2. Cambios en la composición lipídica de autofagosomas y mitocondrias debidas a la activación de autofagia, el envejecimiento y la ausencia de Parkin.**

La caracterización de la composición lipídica de los autofagosomas es necesaria para descifrar los mecanismos de biogénesis de estos orgánulos y los procesos de elongación y fusión con la membrana de los lisosomas. Además, la caracterización de las modificaciones debidas a la eliminación de Parkin puede servir para identificar posibles biomarcadores y dianas terapéuticas de la enfermedad de Parkinson. Del mismo modo, la caracterización de la composición de las membranas mitocondriales y las alteraciones de la misma debidas a la delección de Parkin pueden ayudar a conocer con más detalle algunos de los mecanismos implicados en la disfunción mitocondrial asociada a esta enfermedad. Se han caracterizado cambios en la composición lipídica de las membranas de autofagosomas y mitocondrias que podrían estar debidos a alteraciones en procesos de transferencia de lípidos de membrana o a variaciones en la expresión/actividad de diferentes enzimas modificadoras de lípidos.

Con el fin de ahondar en los mecanismos implicados en la modificación de diferentes clases de lípidos, sería muy interesante analizar la composición lipídica de las membranas del retículo endoplásmico. En este orgánulo se sintetizan una gran cantidad de lípidos que posteriormente se transfieren a las membranas de otros orgánulos subcelulares y, por lo tanto, sería de gran valor conocer las alteraciones en la composición lipídica de este orgánulo. Del mismo modo, la caracterización de la composición lipídica de las membranas de los lisosomas en ratones PK KO y en animales viejos ayudaría a demostrar si las alteraciones en las membranas de los autofagosomas se transfieren a los lisosomas tras la fusión de estos dos orgánulos. En este sentido, está descrito que la modificación de la composición lipídica de lisosomas está asociada a la disfunción de la autofagia mediada por chaperonas debida al envejecimiento (Rodriguez-Navarro, Kaushik et al. 2012)



### 6.2.1. Variaciones de los niveles de PE. Papel de PSD y PEMT en autofagia.

Las diferentes condiciones ensayadas modificaron los valores de especies de PE y PS con ácidos grasos insaturados (figuras 33, 38, 44 y 51). El ayuno incrementó los niveles de estas especies de PE en autofagosomas de animales jóvenes, mientras que no provocó ningún cambio en animales viejos (figura 33). Este aumento iría asociada a la activación de autofagia mediada por el ayuno. Por otro lado, la falta de efectos en orgánulos de animales viejos se relacionaría con la disminución de la autofagia asociada con el envejecimiento (Gelino and Hansen 2012). Esta inhibición de la autofagia podría estar causada por la falta de estimulación de la síntesis de PE en estas condiciones. En este sentido, la suplementación con etanolamina o con PE, es capaz de incrementar la longevidad de modelos celulares mediante la activación de los procesos de autofagia (Rockenfeller, Koska et al. 2015, Rockenfeller, Carmona-Gutierrez et al. 2016).

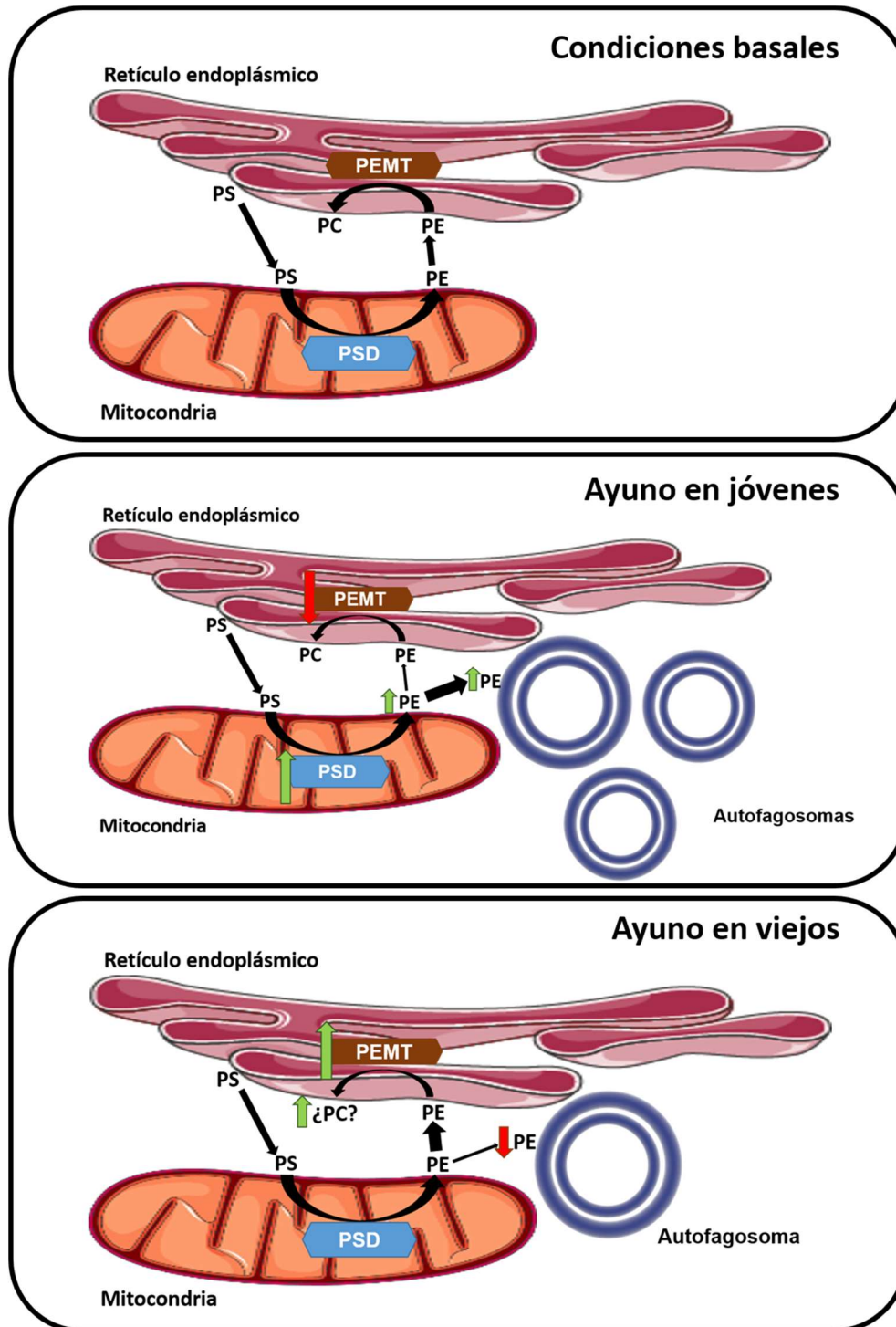
Además del incremento de PE, el ayuno disminuyó el porcentaje de las especies de PS con ácidos grasos insaturados (figura 33). La PE puede ser sintetizada por varias rutas, siendo las principales el ciclo de Kennedy y la actuación de la PSD. El primero media la síntesis de novo de PE, mientras que la PSD sintetiza PE mediante la descarboxilación de PS. La PE sintetizada puede ser transformada mediante metilación por acción de la PEMT para sintetizar PC (Vance 2015). Estas dos enzimas se localizan en orgánulos diferentes, PSD en la mitocondria, y PEMT en el retículo endoplásmico, lo que implica la necesidad de procesos de transferencia de fosfolípidos entre estos orgánulos. Esta transferencia se lleva a cabo en los MAMs (Vance 2014).

El ayuno modificó los niveles de PSD y PEMT. Estos cambios se correlacionaban con los observados para PE y PS (figura 34). PSD, además, actúa preferentemente sobre especies de PS con ácidos grasos insaturados (Kevala and Kim 2001, Bleijerveld, Brouwers et al. 2007), apuntando a la implicación de esta enzima en las alteraciones lipídicas observadas. La relación entre la movilización de fosfolípidos entre distintos orgánulos y PSD, aparte de ser crucial en los MAMs, se ha descrito para la síntesis de autofagosomas. En situaciones de ayuno, PS es translocada del retículo endoplásmico a la mitocondria con el fin de incrementar la PE en este orgánulo por acción de la PSD. La PE sintetizada es incorporada en las membranas de los autofagosomas (Hailey, Rambold et al. 2010). Además, la actividad de PSD y la PE mitocondrial son regulados en situaciones de estrés nutricional por el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, que en último término regula la estabilidad de los MAMs (Thomas, Zhang et al. 2018). (Hailey, Rambold et al. 2010)

El aumento de PSD en mitocondrias y la disminución de PEMT en el retículo endoplásmico observados con el ayuno en animales jóvenes servirían para incrementar la PE en los autofagosomas por transferencia desde las mitocondrias (figura 90).

El ayuno no modificó los niveles de PSD y PEMT en animales viejos, lo que explicaría la ausencia de incremento de PE en los autofagosomas en estas condiciones. Por último, el envejecimiento aumentó los niveles de PEMT y no modificó los de PSD. Los incrementos de PEMT con la edad ya han sido descritos en otros trabajos

## Discusión



**Figura 90: Efectos del ayuno y del envejecimiento sobre la actividad de PSD y PEMT, la transferencia de fosfolípidos entre orgánulos y la síntesis de autofagosomas.** En condiciones basales la movilización de PS y PE en los MAMs, así como la actividad de las enzimas PSD y PEMT regulan los niveles de fosfolípidos en el retículo endoplásmico y la mitocondria. En animales jóvenes, el ayuno aumenta PSD y disminuye PEMT. Estos cambios incrementan la PE mitocondrial que es usada para la síntesis de autofagosomas en los MAMs. En animales viejos, el incremento de PEMT se asocia a una mayor transferencia de PE al retículo endoplásmico para la síntesis de PC. Además, disminuye la transferencia de PE a los autofagosomas, lo que iría asociado con la inhibición de la autofagia asociada al envejecimiento.

## Discusión

(Ilincheta de Boscher, Roque et al. 2000) y explicarían el descenso de PE en los autofagosomas de animales viejos.

Por otro lado, la disminución de las tasas de autofagia en respuesta al ayuno con el envejecimiento ha provocado que se estudie la modulación de la autofagia mediada por restricción de nutrientes como un mecanismo anti-envejecimiento. En este sentido, la restricción de metionina aumenta la esperanza de vida de modelos de ratón de envejecimiento acelerado, modelos de progeria, mediante una serie de mecanismos entre los que se centra la alteración del metabolismo lipídico (Barcena, Quiros et al. 2018). Además, se ha demostrado que la suplementación con S-adenosilmetionina es capaz de activar PEMT incrementando la síntesis de PC a partir de PE revirtiendo las alteraciones detectadas en un modelo de ratón de enfermedad hepática (Martinez-Una, Varela-Rey et al. 2013).

Por lo tanto, la regulación de los niveles de PE en los MAMs y en las mitocondrias es de vital importancia para los procesos de autofagia y más teniendo en cuenta que en estas regiones se forman autofagosomas (Vance 2014, Janikiewicz, Szymanski et al. 2018) (figura 90).

Por otro lado, la eliminación de Parkin alteró la abundancia de PE en las membranas de las mitocondrias aisladas de hígado y cerebro (figuras 44 y 51). Parkin podría estar implicada en el tráfico de fosfolípidos en los MAMs debido a que el transporte de PS a las mitocondrias desde el retículo endoplásmico es regulado por ubiquitinación (Schumacher, Choi et al. 2002). En este sentido, modelos de *Drosophila* carentes de la proteína Parkin presentan alteraciones de los niveles de PE y PS en el retículo endoplásmico y la mitocondria debidos a problemas en la transferencia de lípidos entre estos dos orgánulos (Valadas, Esposito et al. 2018). Los mayores niveles de PSD de mitocondrias de hígados o cerebros de animales PK KO jóvenes (figuras 45 y 51) podrían representar un mecanismo de compensación ante la disminución de PS en este orgánulo. Además, la posible implicación de la ubiquitinación mediada por Parkin en la transferencia de fosfolípidos entre el retículo endoplásmico y la mitocondria podría estar también presente en el tráfico de PE entre la mitocondria y los autofagosomas. La supresión de Parkin desregularía la llegada de PE a los autofagosomas explicando por qué el incremento de PSD en las mitocondrias de los animales PK KO no se tradujo en un aumento de esta clase lipídica en los autofagosomas.

El envejecimiento disminuyó los niveles de PSD en mitocondrias de animales PK KO, lo que redujo la abundancia de las especies de PE con ácidos grasos insaturados en este orgánulo (figura 51). Recientemente, hemos publicado que éstas, y otras alteraciones lipídicas que tienen lugar con el envejecimiento en las mitocondrias de animales PK KO, son importantes en la desregulación de los procesos de autofagia (Gaudioso, Garcia-Rozas et al. 2019).

Todos estos resultados, demuestran el papel que juega la proteína Parkin en la estabilidad de los MAMs, en la composición de fosfolípidos de las membranas mitocondriales y en la transferencia de PE desde este orgánulo a los autofagosomas. La eliminación de Parkin alteró la abundancia de PE en las membranas mitocondriales, lo que podría contribuir a la disfunción mitocondrial observada en este modelo.

## Discusión

Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería muy interesante modular la expresión de enzimas como PSD y PEMT para incrementar PE en respuesta al ayuno en animales viejos. Mediante la inhibición de la expresión de PEMT, con shRNA por ejemplo, podrían estudiarse los efectos del incremento de esta clase lipídica y la posible activación de la autofagia en organismos de edad avanzada.

### **6.2.2. Los cambios en lisofosfolípidos tras eliminar Parkin son distintos en las membranas de los autofagosomas y mitocondrias.**

Los lisofosfolípidos presentan un único ácido graso unido a la molécula de glicerol. Existen diversas rutas de biosíntesis de esta clase lipídica, entre las que se encuentran la escisión de ácidos grasos de fosfolípidos mediada por fosfolipasas, fosfolipasas A1 y A2 fundamentalmente, y la adición de ácidos grasos mediada por acil-CoA aciltransferasas.

Las alteraciones de lisofosfolípidos son capaces de modular la autofagia. El ácido lisofosfatídico inhibe la autofagia favoreciendo la progresión de tumores (Chang, Liao et al. 2007), mientras que LPC puede actuar como señal pro-apoptótica induciendo procesos de apoptosis que requieren elevadas tasas de actividad autofágica para mantener los niveles de ATP necesarios (Qu, Zou et al. 2007). Del mismo modo, alteraciones de la autofagia modulan los niveles de lisofosfolípidos. Se ha descrito que mutaciones de distintos genes atg inducen incrementos en los niveles de LPC y LPE (Avin-Wittenberg, Bajdzienko et al. 2015). Por último en este trabajo se ha detectado una disminución de LPC en autofagosomas con el envejecimiento (figura 32).

Los autofagosomas de animales PK KO presentaban más lisofosfolípidos que los de animales WT (figura 37). Esto pudo deberse a las funciones que tiene Parkin sobre el metabolismo lipídico. Parkin actúa regulando la captación de grasa en el hígado mediante la ubiquitinación de CD36 (Kim, Stevens et al. 2011). Esta proteína, entre otras funciones, regula la liberación de AA mediante la activación de fosfolipasas A2 citosólicas (Kuda, Jenkins et al. 2011).

Además, existen distintas fosfolipasas que actúan regulando autofagia. PNPLA8 (patatin-like phospholipase domain-containing enzyme 8) es una fosfolipasa A2 que actúa promoviendo procesos de lipofagia restaurando alteraciones de enfermedades hepáticas (Kim, Jang et al. 2016). Por otro lado, PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing enzyme 3) también actúa regulando los procesos de lipofagia hepática, y alteraciones de esta fosfolipasa A2 inhiben los procesos de autofagia hepática inducidos por situaciones de ayuno (Negoita, Blomdahl et al. 2019).

En este trabajo se demostró que las alteraciones en lisofosfolípidos en las membranas de autofagosomas de animales PK KO se producían en especies con ácidos grasos insaturados (figura 40). Especies de LPC con ácidos grasos insaturados como 18:2 ó 22:5 participan en procesos de fusión y elongación de las membranas de los autofagosomas (Dall'Armi, Hurtado-Lorenzo et al. 2010), y cambios en sus niveles causan alteraciones en estas membranas que podrían afectar a los procesos de fusión con los lisosomas (Menna-Barreto, Salomao et al. 2009).

## Discusión

Por lo tanto, la posible desregulación de la actividad de fosfolipasas y la consiguiente alteración de lisofosfolípidos con ácidos grasos insaturados debida a la eliminación de Parkin, desregularía el metabolismo lipídico induciendo incrementos de estas clases lipídicas en las membranas de los autofagosomas que, en último término, contribuirían a las alteraciones de la autofagia observadas en estos animales.

Por otro lado, el envejecimiento incrementó los lisofosfolípidos en mitocondrias de animales WT (figura 43). Los niveles de estas clases lipídicas tienen gran importancia en el correcto funcionamiento mitocondrial. LPC es capaz de promover la liberación de calcio desde las mitocondrias al citosol permitiendo la homeostasis del mismo (Rustenbeck, Eibl et al. 1991). Del mismo modo, LPE también regula la liberación de calcio desde las mitocondrias por acción de fosfolipasas A1 (Lee, Park et al. 2015).

El incremento de lisofosfolípidos en las mitocondrias WT podría constituir un mecanismo protector frente al envejecimiento y la disfunción de la homeostasis de calcio asociada (Nikolopoulou and Tavernarakis 2012). La ausencia de regulación de los niveles de LPC y LPE con el envejecimiento en las mitocondrias PK KO podría estar implicada en los déficits de la funcionalidad mitocondrial observados en este modelo (Damiano, Gautier et al. 2014). Parkin actúa ubiquitinando a la fosfolipasa C y de esta forma regula la homeostasis de calcio (Sandebring, Dehvari et al. 2009). La implicación de Parkin en la transferencia de calcio entre el retículo endoplásmico y la mitocondria es necesaria para la autofagia mediada por el ayuno y para la mitofagia dependiente de Parkin (MacVicar, Mannack et al. 2015). Además, la enfermedad de Parkinson cursa con alteraciones de la homeostasis de calcio y las neuronas dopaminérgicas son especialmente vulnerables a alteraciones de sus concentraciones (Wilson and Callaway 2000). En este sentido, en nuestro grupo se ha caracterizado la agregación de transportadores de calcio en cerebros de ratones PK KO viejos (datos no publicados). La desregulación de los niveles de lisofosfolípidos, y la alteración de la función mitocondrial son también procesos clave en los casos familiares de la enfermedad mediados por mutaciones de PLA2G6. Esta fosfolipasa A2 se localiza en la mitocondria y sus mutaciones afectan a la funcionalidad y morfología mitocondrial (Kingham, Castillo-Quan et al. 2015). Los defectos en la funcionalidad de este orgánulo se traducen en alteraciones de la cadena respiratoria, menor síntesis de ATP, incremento de la peroxidación lipídica por aumento de la producción de ROS y desregulación de la homeostasis de calcio en astrocitos (Strokin, Seburn et al. 2012).

Por lo tanto, la regulación de los niveles de lisofosfolípidos en las membranas de las mitocondrias contribuye a mantener la homeostasis de calcio y la funcionalidad mitocondrial en organismos de edad avanzada. La ausencia de regulación observada en mitocondrias PK KO podría implicar disfunción mitocondrial e incremento de la producción de ROS y de la peroxidación lipídica. Además, la supresión de Parkin impediría la degradación de estas mitocondrias dañadas mediante mitofagia, lo que conllevaría un mayor impacto de los efectos de la disfunción mitocondrial.

Los resultados obtenidos de los distintos análisis lipídicos apuntan a la regulación inversa de lisofosfolípidos en las membranas de los autofagosomas y mitocondrias, e identifican la actividad de enzimas modificadoras de estos lípidos como aspectos clave en las alteraciones de la autofagia y de la funcionalidad mitocondrial

## Discusión

mediadas por la eliminación de Parkin. La modulación de la actividad de fosfolipasas, con el fin de restaurar los niveles de lisofosfolípidos alterados en el modelo PK KO, podría constituir una diana terapéutica en la enfermedad de Parkinson.

### 6.2.3. Posibles implicaciones de los cambios en Cer en autofagia y funcionalidad mitocondrial.

Las Cer, y otras clases de esfingolípidos, regulan autofagia de diferentes maneras. El incremento de Cer es capaz de activar autofagia mediante la inhibición de la PKB (Proteína quinasa B) y la sobreactivación de beclina 1 (Scarlatti, Bauvy et al. 2004). Además de la inducción de autofagia por alteraciones de esta clase lipídica, se ha descrito que ésta también puede producirse por cambios en la longitud de los ácidos grasos que forman estos lípidos. La conversión de Cer con ácidos grasos cortos a Cer con ácidos grasos más largos, por acción de CerS, es necesario para la activación de autofagia (Scarlatti, Bauvy et al. 2004).

Los niveles de Cer, y de otros esfingolípidos, están altamente regulados y ello se debe a que la acumulación exacerbada de estas clases lipídicas tiene efectos dañinos como la inducción de apoptosis o la alteración de la función lisosomal. En situaciones de estrés nutricional, incrementos de Cer pueden inducir la muerte celular inhibiendo la expresión de transportadores de nutrientes (Guenther, Peralta et al. 2008). Además, la acumulación de Cer puede afectar a la localización lisosomal de la proteína cathepsina B, lo que en último término, induce apoptosis (De Stefanis, Reffo et al. 2002). Por último, el aumento de dhCer induce permeabilización de la membrana lisosomal, liberación de cathepsinas y activación de apoptosis (Hernandez-Tiedra, Fabrias et al. 2016).

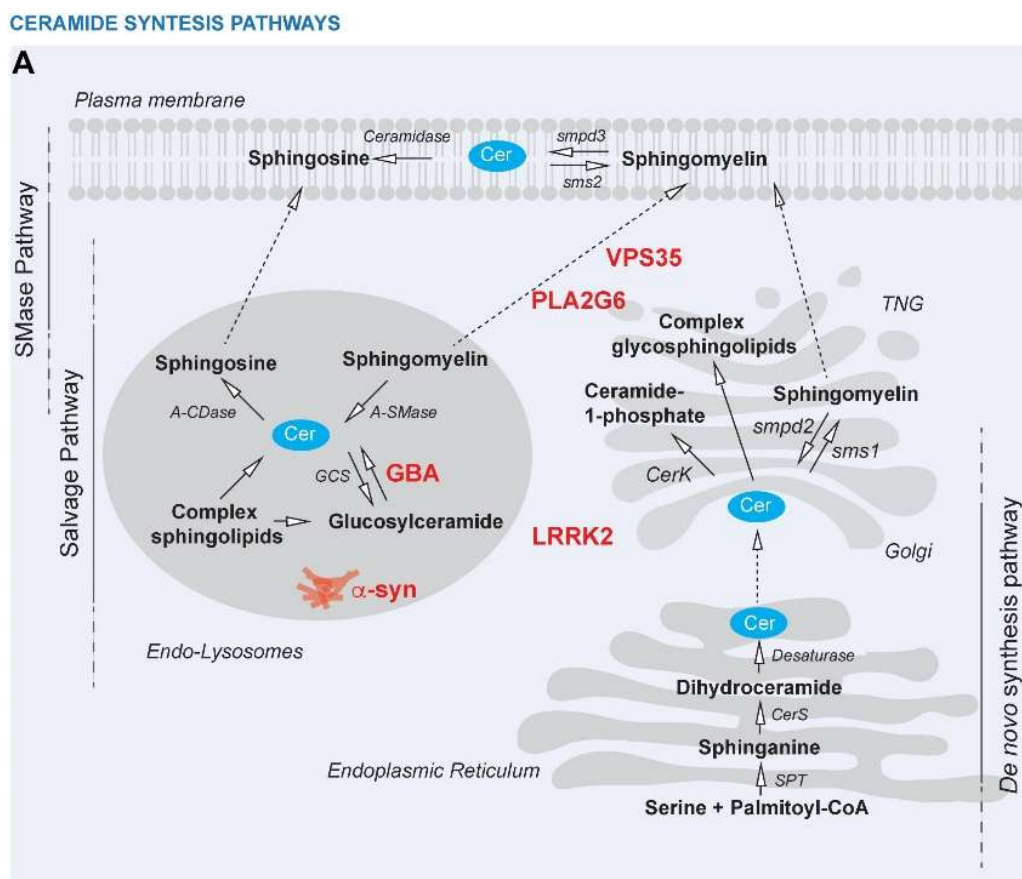
Los efectos de la acumulación de esfingolípidos sobre la función lisosomal se deben a que en este orgánulo se localizan numerosas enzimas modificadoras de esfingolípidos (Plotegher, Bubacco et al. 2019) (figura 91). Alteraciones de algunas de estas enzimas causan enfermedades neurológicas como Parkinson (por mutaciones del gen que codifica para la GBA) (Gegg and Schapira 2018), o Niemann Pick tipo A (por mutaciones del gen que codifica para la esfingomielinasa ácida) (Ledesma, Prinetti et al. 2011).

La supresión de Parkin incrementó las Cer en las membranas de autofagosomas (figura 37). Está descrito que los porcentajes de esta clase lipídica son mayores en afectados de enfermedades neurodegenerativas (Filippov, Song et al. 2012). Este incremento se ha descrito en personas de edad avanzada afectadas por la enfermedad y, recientemente, también ha sido descrito en casos de temprana aparición. PLA2G6 regula los niveles de Cer, y mutaciones que causan pérdida de función de la proteína inducen incrementos de esta clase lipídica (Lin, Lee et al. 2018). Además, Parkin regula la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en procesos de apoptosis en células tratadas con Cer (Unschuld, Dachsel et al. 2006).

La desregulación de esfingolípidos en estas membranas ya ha sido descrita en otros trabajos. Incrementos de esta clase lipídica en el retículo endoplásmico (lugar de síntesis de novo; figura 91), se traducen en aumentos en los autofagosomas por

## Discusión

transferencia lipídica entre estos dos orgánulos (Hernandez-Tiedra, Fabrias et al. 2016). Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería muy interesante analizar la composición lipídica de las membranas del retículo endoplásmico con el fin de caracterizar si el incremento de Cer observado en autofagosomas se produce también en este orgánulo. Dado que la síntesis de novo de Cer se produce en el retículo endoplásmico, el posible incremento de esta clase lipídica podría deberse a alteraciones en la expresión o actividad de enzimas implicadas en su síntesis.



**Figura 91: Síntesis de novo y modificación de esfingolípidos.** Se muestran las localizaciones subcelulares donde tienen lugar las distintas reacciones así como la relación con proteínas implicadas en la aparición de la enfermedad de Parkinson.  $\alpha$ -syn:  $\alpha$ -sinucleína. GBA: Glucocerebrosidase. LRRK2: Leucine-Rich Repeat Kinase 2. PLA2G6: Phospholipase A2 group VI. VPS35: Vacuolar Protein Sorting 35. Cer: Ceramida. Tomado de (Plotegher, Bubacco et al. 2019).

Del mismo modo, sería muy interesante analizar si la eliminación de Parkin también aumenta las Cer en las membranas de los lisosomas. El incremento de los niveles de Cer en autofagosomas de animales PK KO jóvenes podría producirse también en la membrana de los lisosomas debido a los mecanismos de fusión entre las membranas de estos dos orgánulos. El incremento de Cer en los lisosomas podría ser una de las causas de la disfunción lisosomal asociada a la enfermedad de Parkinson (Nguyen, Wong et al. 2019). En animales viejos, el incremento de esta clase lipídica en PK KO (figura 37), podría ser uno de los factores que contribuyesen a la disfunción de la autofagia observada en estos animales (Gaudioso, Garcia-Rozas et al. 2019).

## Discusión

La alteración de Cer en las membranas de los autofagosomas tiene gran relevancia debido a las funciones que juegan estos lípidos en el mantenimiento de la fluidez de las membranas celulares que, en último término, afectan a los procesos de fisión y fusión de membranas (Mencarelli and Martinez-Martinez 2013). En este sentido, está demostrado que los efectos sobre la fluidez de membrana son distintos para Cer con ácidos grasos cortos o largos. Mientras que las especies con ácidos grasos cortos perturban el orden de las bicapas lipídicas, las especies con ácidos grasos largos estabilizan las membranas (Mencarelli and Martinez-Martinez 2013). En este trabajo, se han caracterizado cambios distintos de las Cer con ácidos grasos cortos o largos en las membranas de los autofagosomas y en respuesta a la supresión de Parkin (figura 41). Animales PK KO presentaban mayores porcentajes de especies largas tanto en animales jóvenes como viejos (figura 41). Además de alteraciones de los niveles totales de Cer, la enfermedad de Parkinson cursa con alteraciones en la longitud de los ácidos grasos de esta clase lipídica (Abbott, Li et al. 2014). Por lo tanto, el cambio de la longitud de las Cer en los autofagosomas PK KO podría contribuir a la disfunción de la autofagia y la funcionalidad lisosomal asociada a la enfermedad.

Por otro lado, la eliminación de Parkin y el envejecimiento también variaron las Cer en las mitocondrias (figura 43). Las Cer localizadas en la mitocondria inducen autofagia. Estos lípidos son capaces de unirse a la proteína LC3 y esta unión actúa como señal para la degradación mediante mitofagia de mitocondrias dañadas (Sentelle, Senkal et al. 2012). Las Cer localizadas en la mitocondria son transferidas desde los MAMs, donde se ubican enzimas implicadas en la síntesis de novo de ésta, y de otras clases de esfingolípidos (Janikiewicz, Szymanski et al. 2018).

La supresión de Parkin incrementó las Cer en mitocondrias (figura 43). Este aumento podría constituir un mecanismo de compensación para contrarrestar la ausencia de mitofagia. Al aumentar la proporción de Cer en las mitocondrias se produciría la lipidación de LC3 y la degradación de mitocondrias mediante un mecanismo independiente de Parkin. Además, este mecanismo iría en la línea de trabajos que han demostrado que la eliminación de Parkin sobreactiva la autofagia como mecanismo de compensación (Casarejos, Solano et al. 2009).

Por otro lado, Parkin protege frente a procesos de muerte celular inducidos por Cer. Este efecto se debe a la actividad E3 ubiquitina ligasa de Parkin, que actúa inhibiendo la liberación de Cit C desde la mitocondria y la activación de caspasa-3 inducida por Cer (Darios, Corti et al. 2003). En ausencia de Parkin, el incremento de Cer y los posibles procesos de muerte celular asociados, podrían favorecer la muerte neuronal asociada a la enfermedad de Parkinson.

El aumento de Cer en mitocondrias de animales PK KO jóvenes se produjo en aquellas especies con ácidos grasos largos. Estas especies de ceramidas causan disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (Law, Liao et al. 2018). El incremento del daño mitocondrial y la ausencia de mitofagia dependiente de Parkin podrían ser unas de las causas de las disfunciones mitocondriales que caracterizan a la enfermedad. En animales PK KO se detectaron más Cer OH (figura 53), debido al incremento del estrés oxidativo en estas condiciones. El aumento de Cer a nivel mitocondrial podría estar contribuyendo al exceso de peroxidación lipídica.



## Discusión

Por otro lado, el envejecimiento aumentó los niveles de Cer con ácidos grasos cortos en mitocondrias de animales WT (figura 48). Estas especies de Cer son las que actúan lipidando a la proteína LC3. Los incrementos de Cer con ácidos grasos cortos y de los procesos de mitofagia inducidos por estos lípidos podrían contribuir a degradar mitocondrias dañadas. El envejecimiento está asociado a la pérdida de funcionalidad mitocondrial (Sun, Youle et al. 2016) y el incremento de esta clase lipídica podría contribuir a mantener mitocondrial funcionales. La desregulación de Cer en las mitocondrias PK KO podría deberse a la ausencia de los procesos de mitofagia dependientes de Parkin y, por lo tanto, contribuiría a la disfunción mitocondrial observada en estos animales.

En el hígado el incremento de la hidroxilación de Cer asociada a la supresión de Parkin se produjo en animales jóvenes. Sin embargo, en el cerebro este efecto se produjo en animales viejos (figura 53). La alteración de los procesos de hidroxilación de Cer se ha asociado con enfermedades como la leucodistrofia y la paraparesia espástica hereditaria. Estas enfermedades se asocian a mutaciones en el gen que codifica para la FA2H (Fatty Acid 2-Hydroxylase) (Edvardson, Hama et al. 2008, Dick, Eckhardt et al. 2010) y, por lo tanto, a cambios en la hidroxilación de esta clase lipídica. Por el momento, se desconocen los efectos del incremento de la hidroxilación de Cer en el modelo de ratón PK KO.

Todos estos resultados demostraron que la eliminación de Parkin y el envejecimiento alteraban la abundancia relativa de Cer en membranas de orgánulos subcelulares. Esta regulación dependía de la longitud de los ácidos grasos que formaban estos lípidos. La alteración de los niveles de Cer en los orgánulos de animales PK KO podría tener implicaciones sobre la actividad autofágica, la funcionalidad mitocondrial y la oxidación lipídica.

### **6.2.4. Implicaciones en la actividad autofágica y mitocondrial de los cambios observados en los niveles de éter lípidos.**

El ayuno incrementó la proporción de PE-O en autofagosomas de animales jóvenes (figura 35). El aumento de esta clase lipídica en condiciones de activación de autofagia podría estar asociado al papel que juegan estos lípidos en los procesos de fusión y fisión de membranas. Está descrito que la presencia de PE-O en vesículas lipídicas incrementa los procesos de fusión con otras membranas (Glaser and Gross 1994). El aumento de los niveles de PE-O en las membranas de los autofagosomas podría estar asociado a una activación de los procesos de fisión de membranas de orgánulos, como el retículo endoplásmico o la mitocondria, para la formación de los autofagosomas y de fusión de las membranas de los mismos con los lisosomas. En este sentido, los éter lípidos son capaces de activar autofagia en experimentos in vitro (Samadder, Bittman et al. 2009). Por lo tanto, el incremento de los niveles de PE-O contribuiría a la activación de autofagia inducida por el ayuno.

Los cambios observados en esta clase lipídica en respuesta al ayuno en animales jóvenes son los mismos que los detectados para PE (figura 33). Estas dos clases lipídicas

## Discusión

presentan etanolamina como grupo polar. La etanolamina se une a la proteína LC3 permitiendo su anclaje a la membrana de los autofagosomas y, por lo tanto, PE-O podría actuar lipidando LC3. Se ha demostrado la unión de LC3 a clases lipídicas distintas de PE, como CL (Chu, Ji et al. 2013), Cer (Sentelle, Senkal et al. 2012) o PS (Sou, Tanida et al. 2006). Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado la posible unión de LC3 a la etanolamina de PE-O. Esta unión implicaría que el aumento de esta clase lipídica, como los observados en respuesta al ayuno, podrían contribuir al incremento de la actividad autofágica por el aumento de la unión de LC3 a las membranas de los autofagosomas.

Por otro lado, el ayuno no alteró la abundancia de PE-O en animales viejos (figura 35). Esta ausencia de cambios es la misma que la detectada para PE (figura 33) y podría deberse a la inhibición de la autofagia debida al envejecimiento. La falta de cambios de PE-O debida al ayuno en estos animales podría contribuir a las menores tasas de actividad autofágica.

La supresión de Parkin alteró los niveles de PC-O y PE-O en las membranas de los autofagosomas (figura 37). Los cambios en estas clases lipídicas asociados a la delección de Parkin se produjeron en animales viejos. Los animales PK KO presentaban menos PC-O que los WT. La disminución de éter lípidos asociada al envejecimiento y a la enfermedad de Parkinson ya ha sido descrita (Fabelo, Martin et al. 2011). Los menores porcentajes de PC-O en los animales PK KO irían asociados a una disminución en los procesos de fusión y fisión de membranas, y podrían relacionarse con las menores tasas de actividad autofágica detectadas en estos animales. En cambio, los valores de PE-O eran mayores en los animales PK KO viejos respecto a los animales WT del mismo grupo de edad (figura 37). Los cambios observados en esta clase lipídica son distintos a los observados en PE, asociados a una disminución de la actividad autofágica, y a los detectados en muestras post-mortem de afectados de la enfermedad de Parkinson (Fabelo, Martin et al. 2011). Sería necesario llevar a cabo más experimentos para poder explicar la relación entre Parkin y PE-O en las membranas de los autofagosomas y las implicaciones de las alteraciones detectadas.

Los valores de éter lípidos de las membranas de mitocondrias de cerebro también se vieron afectadas por la supresión de Parkin. Las mitocondrias de animales PK KO, tanto jóvenes como viejos, presentaban menores porcentajes de estas clases lipídicas que las de animales WT (figura 52). Los éter lípidos presentan funciones antioxidantes ya que son capaces de captar ROS e impedir que los procesos de oxidación lipídica se propaguen (Sindelar, Guan et al. 1999). La ausencia de Parkin incrementa los niveles de ROS debido a la falta de degradación de mitocondrias disfuncionales (Ansari, Khan et al. 2018). Los menores niveles de PC-O y PE-O en estas mitocondrias impedirían la neutralización de ROS y contribuirían a incrementar los procesos de oxidación proteica y lipídica.

Los cambios detectados en las mitocondrias de cerebro contrastaban con la ausencia de alteraciones de PC-O y PE-O en las mitocondrias de hígado (figura 52). El hígado es el órgano con mayores tasas de síntesis de éter lípidos. Ésta comienza en el peroxisoma y finaliza en el retículo endoplásmico, dos orgánulos que presentan contactos con la mitocondria (Vance 2014, Fransen, Lismont et al. 2017). Las mayores tasas de síntesis de éter lípidos en el hígado conllevarían una mayor transferencia de esta clase lipídica a las mitocondrias mediante transferencia de lípidos desde el retículo

## Discusión

endoplásmico y el peroxisoma y, por lo tanto, una mayor regulación de los niveles mitocondriales de estos lípidos. Sin embargo, en el cerebro, al haber menores tasas de síntesis de éter lípidos, los niveles de éstos en las mitocondrias podrían estar afectados por el transporte desde el hígado, proceso que podría verse alterado por la supresión de Parkin.

Los cambios de PC-O y PE-O en respuesta al ayuno, al envejecimiento y a la eliminación de Parkin podrían afectar a la autofagia y a la funcionalidad mitocondrial regulando procesos como la fisión/fusión de membranas de autofagosomas, la lipidación de LC3 o la neutralización de ROS. La falta de datos relativos a la regulación de la autofagia mediada por éter lípidos, y a la incorporación de estos lípidos a las membranas de los autofagosomas (membranas de origen, efectos sobre la lipidación de LC3, fusión de membranas de autofagosomas y lisosomas) los ha hecho objeto de los experimentos in vitro llevados a cabo en este trabajo.

Tomando en conjunto los datos obtenidos en los análisis lipídomicos llevados a cabo en este trabajo, quedó demostrado que la activación de autofagia, la delección de Parkin y el envejecimiento alteran la composición lipídica de las membranas de autofagosomas y mitocondrias. Las variaciones de clases y especies lipídicas afectarían a la actividad de la autofagia y a la funcionalidad mitocondrial. Además, podrían ser utilizados como biomarcadores o dianas terapéuticas capaces de revertir disfunciones asociadas a la enfermedad de Parkinson, como el descenso de la actividad autofágica con la edad o la disfunción mitocondrial y el incremento de los niveles de ROS.

### **6.3. La supresión de Parkin modifica las tasas de autofagia basal y en ausencia de suero.**

Tomando como base las alteraciones lipídicas detectadas, y sus posibles implicaciones regulando la autofagia, se buscó la manera de modular la síntesis/transferencia de clases específicas de lípidos con el fin de corregir las alteraciones inducidas por la supresión de Parkin. El empleo de astrocitos en los experimentos in vitro de este trabajo se debe a varios factores. Estas células presentan elevadas tasas de actividad mitocondrial y un intenso metabolismo lipídico en respuesta a la ausencia de nutrientes con el fin de generar metabolitos que son usados por las neuronas (Guzman and Blazquez 2001). Además, la modulación de sus tasas autofágicas revierte la muerte neuronal asociada a la neurodegeneración (Perucho, Gomez et al. 2016, Pomilio, Pavia et al. 2016, Erustes, Stefani et al. 2018) y son capaces de captar y degradar agregados proteicos (Braak, Sastre et al. 2007). Por otro lado, el modelo de ratón PK KO ha sido estudiado en el departamento durante los últimos años y los trabajos publicados han puesto de manifiesto las alteraciones que ocasiona la eliminación de Parkin en las células de glía. Las células gliales carentes de esta proteína son más resistentes a la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma debido a una sobreactivación de la ruta autofágica (Casarejos, Solano et al. 2009). Además, presentan menores número de astrocitos e índices de proliferación, incremento de la expresión de proteínas proapoptóticas, etc...; estas alteraciones se acentúan a medida que aumenta el tiempo de cultivo de las células, es decir, se agravan con la “edad” (Solano, Casarejos et al. 2008).

## Discusión

Se eligieron los éter lípidos para los experimentos *in vitro* porque sus niveles cambiaban en las membranas de los autofagosomas con el ayuno y de las mitocondrias con la eliminación de Parkin, y debido al posible papel que podrían tener regulando la autofagia (favorecer los procesos de fusión/fisión de membranas, posible lipidación de LC3) y la funcionalidad mitocondrial (papel antioxidante, localización mitocondrial de éter lípidos exógenos (Kuerschner, Richter et al. 2012)), dos de los procesos celulares alterados en la enfermedad de Parkinson.

La supresión de Parkin incrementó las tasas de actividad autofágica en astrocitos en cultivo en condiciones basales (figuras 54 y 55). Este aumento de la actividad autofágica representa un mecanismo de compensación frente a la ausencia de la ubiquitinación de proteínas mediada por Parkin y su posterior eliminación mediante el sistema ubiquitina-proteasoma. Este resultado iría en la línea de artículos ya comentados (Casarejos, Solano et al. 2009). Sin embargo, en condiciones de ayuno, los astrocitos PK KO no respondieron a este estímulo incrementando los procesos de autofagia como sí ocurría en las células WT (figuras 54 y 55). Esta falta de respuesta también tiene lugar en astrocitos PK KO cultivadas en medio definido sin suero (Solano, Casarejos et al. 2008). La ausencia de activación de la autofagia en condiciones de ayuno en las células PK KO podría ser debida a algunas de las alteraciones lipídicas detectadas en las membranas de autofagosomas de estos animales. La desregulación de la autofagia que se observó en astrocitos PK KO al retirar el suero es probable que también se produzca en otras situaciones, como por ejemplo, ante la formación de pequeños oligómeros de proteínas, lo que en último término, conllevaría la formación de agregados de proteínas que producen la muerte neuronal característica de la enfermedad de Parkinson.

Por otro lado, se caracterizó la morfología mitocondrial en astrocitos en condiciones basales y tras la retirada de suero. Aunque la retirada de suero no induce una mitofagia selectiva, es muy interesante el estudio de los efectos de un estrés metabólico como es la retirada de suero, y si la supresión de Parkin tiene efectos sobre la morfología mitocondrial tras este estímulo.

Al estudiar la morfología mitocondrial en condiciones basales y en condiciones de ayuno, se observaron cambios debidos a la supresión de Parkin en la circularidad y en el número de estos orgánulos. La retirada de suero incrementó la circularidad en las células gliales WT sin afectar a este parámetro en las células PK KO (figura 58). Este hecho podría considerarse como una falta de respuesta en las células PK KO frente a un estrés metabólico como es la inducción de autofagia mediante la retirada de suero.

El aumento de la circularidad y, por lo tanto, la pérdida de la morfología fibrilar característica de las mitocondrias funcionales que tenía lugar en las células WT tras la retirada de suero, contrasta con los resultados publicados en otros trabajos (Rambold, Cohen et al. 2015). En este trabajo, los autores demostraron que en condiciones de estrés nutricional (incubación en HBSS, medio muy pobre en nutrientes) se producía un aumento de los procesos de fusión mitocondrial que permitían un correcto tráfico de ácidos grasos en el interior de la célula. Debido a diferencias en el tipo celular utilizado, y a los distintos tipos de estrés metabólico utilizado, los resultados entre los dos trabajos no tienen por qué ir en el mismo sentido. Sería muy interesante profundizar en los mecanismos por los cuales se produjo una circularización de las mitocondrias en células

## Discusión

WT ante la retirada de suero. Además la reducción del tamaño de las mitocondrias de astrocitos WT podría ir asociada a procesos de transferencia de mitocondrias entre estas células y las neuronas que ya han sido descritos en otros trabajos ((Hayakawa, Esposito et al. 2016)). En las células PK KO no se produjo este efecto apuntando a la posible implicación de Parkin en los cambios del área mitocondrial necesarios para la transferencia intercelular de este orgánulo.

Además, la retirada de suero aumentó el número de mitocondrias en astrocitos WT (figura 58). Este incremento sería utilizado para aumentar las tasas de producción de energía en condiciones de estrés metabólico. La proteína Parkin actúa regulando los procesos de biogénesis de mitocondrias (Kuroda, Mitsui et al. 2006) y, por lo tanto, su supresión impediría que los astrocitos respondieran a la retirada de suero incrementando el número de mitocondrias y la producción de energía.

Por último, la eliminación de Parkin y la retirada de suero no alteraron la funcionalidad mitocondrial (figura 59). Aunque se detectaron variaciones en la morfología mitocondrial en células PK KO con el ayuno, éstas no se tradujeron en una disfunción mitocondrial en estas células. Ello pudo deberse a que el estrés metabólico mediado por la ausencia de suero no era de tal magnitud como para promover procesos de mitofagia dependiente de Parkin.

Todos estos resultados demostraron que si bien las células PK KO presentaban tasas basales de autofagia mayores que las de células WT, no eran capaces de regular la actividad autofágica y la morfología mitocondrial en condiciones de estrés nutricional.

El siguiente objetivo del trabajo consistió en caracterizar los efectos de la inducción de daño mitocondrial en astrocitos WT y PK KO. La incubación con CCCP no aumentó la actividad autofágica ni en células WT ni PK KO (figuras 60 y 61). La falta de efectos en células PK KO pudo deberse a los bajos niveles de esta proteína en astrocitos (son mucho más bajos que, por ejemplo, en las neuronas) (Stichel, Augustin et al. 2000). Además, la existencia de mecanismos de mitofagia independientes de Parkin podría estar mediando la degradación selectiva de mitocondrias dañadas por el tratamiento con CCCP en astrocitos PK KO (Villa, Marchetti et al. 2018). Por otro lado, el CCCP interfiere con la degradación lisosomal de componentes englobados en los autofagosomas (Padman, Bach et al. 2013). Esto podría explicar la ausencia de incrementos del ratio LC3-II/LC3-I en presencia de CCCP y bloqueo de la degradación lisosomal.

El CCCP afectó a la funcionalidad mitocondrial en células WT y PK KO (figura 64). En condiciones de daño mitocondrial aumentó la respiración basal en los dos tipos de células, seguramente por el efecto protonóforo del CCCP. Además, las células PK KO presentaban menores tasas de respiración mitocondrial máxima y capacidad respiratoria de reserva (figura 64). El descenso de estos dos parámetros se pudo deber a la ausencia de mitofagia dependiente de Parkin en estas células.

Estos resultados demostraron que si bien la suplementación con CCCP no incrementaba las tasas de actividad autofágica, sí alteraba la funcionalidad mitocondrial en las células PK KO debido a la ausencia de procesos de mitofagia dependiente de Parkin.

### **6.4. El aumento de la síntesis de éter lípidos en astrocitos incrementa la capacidad autofágica y mitocondrial de forma dependiente de Parkin.**

Los éter lípidos de las membranas de autofagosomas y mitocondrias variaban en respuesta a la activación de autofagia y a la supresión de Parkin (figuras 35 y 52). La estimulación de la síntesis de éter lípidos mediante la adición de HG ha sido descrita en otros trabajos debido a que este compuesto actúa como precursor entrando en su ruta de biosíntesis (Bergan, Skotland et al. 2013).

El HG alteró la composición lipídica de astrocitos en cultivo. Aumentaron los porcentajes de PC-O y PE-O en los dos tipos de células (figura 65). Además, se detectó una disminución de PE en células WT y PK KO (figura 65). Existe una relación de equilibrio entre PE y PE-O. En enfermedades que cursan con disminución de éter lípidos, se ha demostrado que los niveles de PE se encuentran aumentados. De una forma análoga, el incremento de PE-O disminuye PE (Dorninger, Brodde et al. 2015). Por último, se detectaron incrementos de otras clases lipídicas (figura 65). Éstos seguramente se debieron a procesos de transferencia del HG desde los éter lípidos. Estos mecanismos de transferencia ya se han descrito en otros trabajos (Bergan, Skotland et al. 2013).

La retirada de suero en presencia de HG varió la abundancia de distintas clases lipídicas. Aumentaron PC-O en células WT y PE-O en los dos tipos de células (figura 67). La falta de incremento de PC-O en las células PK KO pudo deberse a alteraciones en los procesos de captación de HG o de incorporación del mismo a los éter lípidos en estas células. Además, disminuyó PE en astrocitos WT y PK KO (figura 67). En estas condiciones las células presentaban los mismos valores de PE que de PE-O (figura 67). El incremento de PE-O y la disminución de PE en condiciones de activación de autofagia podría tener implicaciones en los procesos de lipidación de LC3. Esta proteína podría estar uniéndose a PE-O, lo que tendría implicaciones en los procesos de autofagia.

Además de las alteraciones a nivel lipídico, la suplementación con HG incrementó las tasas de actividad autofágica en astrocitos WT en condiciones de ayuno (figuras 69 y 70). En presencia de suero, la falta de un estímulo inductor de autofagia propició que el aumento de los niveles de éter lípidos no se tradujese en un incremento de la actividad autofágica. Los efectos de los éter lípidos sobre la autofagia eran dependientes de la proteína Parkin, bien por la implicación de esta proteína en los procesos de transferencia entre orgánulos, necesarios para la síntesis de autofagosomas, o bien por otros procesos. La ausencia de respuesta de las células PK KO al aumento de éter lípidos se correlacionaba con la falta de respuesta que presentaban estas células a la retirada de suero.

En cambio, la estimulación de la síntesis de éter lípidos no alteró la funcionalidad mitocondrial ni en células WT ni en células PK KO (figura 73). En este sentido, la suplementación de células en cultivo con éter lípidos glicosilados exógenos no altera el potencial de membrana mitocondrial (Samadder, Bittman et al. 2009). La ausencia de cambios pudo deberse a la falta de un agente inductor de daño mitocondrial, al igual que no se producía aumento de la autofagia en condiciones basales al no haber un agente

## Discusión

inductor de autofagia. Lo mismo podría estar ocurriendo para los efectos del incremento de éter lípidos sobre la funcionalidad mitocondrial y, por lo tanto, los efectos solo se harían patentes en presencia de un agente promotor de daño mitocondrial como el CCCP.

El flujo de LC3 no se vio alterado por el incremento en la síntesis de éter lípidos en condiciones de activación de mitofagia (figuras 75 y 76). Esto pudo deberse a que el incremento de éter lípidos solo propicia el aumento de la capacidad autofágica en presencia de un factor activador como la retirada de suero.

En cambio, la adición de HG revirtió algunos de los efectos deletéreos de la incubación con CCCP sobre la funcionalidad mitocondrial (figura 79). El CCCP, debido a su efecto protonóforo, incrementó las tasas de respiración basal de astrocitos en cultivo. Este compuesto, al desacoplar el gradiente de protones en la membrana interna mitocondrial aumentó la respiración basal. La incubación con HG logró revertir el incremento de la tasa de respiración basal, siendo este efecto más acusado en las células WT (figura 79). Este efecto pudo ser debido al papel antioxidante atribuido a los éter lípidos. La disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial asociada a la incubación con CCCP provoca un incremento de ROS. La generación de ROS ha sido descrita como uno de los daños mitocondriales que inducen mitofagia dependiente de Parkin (Xiao, Goh et al. 2017). El aumento de los niveles de ROS podría ser neutralizado por los éter lípidos evitando la propagación de los procesos de oxidación lipídica (Sindelar, Guan et al. 1999) en un proceso independiente de la proteína Parkin.

Por otro lado, se observó que en condiciones de daño mitocondrial los astrocitos PK KO presentaban menores tasas de respiración mitocondrial máxima y de capacidad respiratoria de reserva (figura 79). Estos dos parámetros son indicadores de la actividad máxima de la cadena respiratoria mitocondrial por célula y vienen determinados por el número y el estado funcional de las mitocondrias. La suplementación con CCCP promueve procesos de mitofagia dependiente de Parkin (Narendra, Tanaka et al. 2008) y la ausencia de estos procesos en células PK KO explicaría las menores tasas de estos dos parámetros en estas células. La incubación con HG no logró aumentar las tasas de estos parámetros en las células PK KO (figura 79). Esto pudo deberse a que el incremento de los niveles de éter lípidos no era capaz de inducir mitofagia con el fin de degradar las mitocondrias dañadas.

Estos resultados permitieron identificar los efectos de la estimulación de la síntesis de éter lípidos sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial. En condiciones basales (presencia de suero), el incremento de los niveles de éter lípidos no alteró ni la autofagia ni la actividad mitocondrial, pero hacía que los astrocitos estuviesen más preparados para responder a estímulos que inducían autofagia o mitofagia. En condiciones de ayuno, se activaba la autofagia en células WT pero no en PK KO, indicando que este proceso dependía de la proteína Parkin. Por otro lado, en presencia de CCCP, el incremento de éter lípidos logró revertir el aumento no fisiológico de la respiración basal en ambos tipos de células, aunque no fue capaz de paliar los efectos de la supresión de Parkin sobre la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva.

Diversos trabajos han estudiado el efecto de la suplementación de éter lípidos, o de precursores de la síntesis de esta clase lipídica, sobre distintas enfermedades humanas.

## Discusión

En este sentido, el análogo de éter lípidos PPI-1011 es capaz de disminuir las disquinesias asociadas al tratamiento con L-DOPA en un modelo animal de enfermedad de Parkinson (Bourque, Gregoire et al. 2018). Por otro lado, la suplementación con plasmalógenos mejora las funciones cognitivas en afectados de la enfermedad de Alzheimer (Fujino, Yamada et al. 2017). Sería muy importante evaluar si la activación de autofagia mediada por el incremento de éter lípidos podría revertir algunas de las alteraciones asociadas con las enfermedades neurodegenerativas como la agregación proteica. En este sentido, la adición de precursores o plasmalógenos en la dieta de modelos animales de Parkinson permitiría estudiar si los efectos protectores se deben a la actividad autofágica in vivo. Además, el tratamiento con HG en animales viejos permitiría determinar si en estas condiciones el incremento de esta clase lipídica activaría autofagia revirtiendo la inhibición mediada por el envejecimiento y, por lo tanto, si podría ser considerado como un tratamiento anti-envejecimiento.

### **6.5. La localización subcelular de los éter lípidos es clave para sus efectos sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial.**

Se llevó a cabo la incubación con astrocitos WT y PK KO con eLpPC con el fin de visualizar si la incorporación de los éter lípidos en las membranas de los autofagosomas era responsable de sus efectos sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial. Está descrito que la regulación de la autofagia mediada por lípidos, puede deberse, entre otros factores, a efectos sobre la maquinaria que regula autofagia (Dall'Armi, Devereaux et al. 2013). En este sentido, se ha descrito que los ácidos grasos actúan modulando la autofagia. El ácido palmítico inhibe autofagia (Hernandez-Caceres, Toledo-Valenzuela et al. 2019) mientras que el ácido oleico la activa (Niso-Santano, Malik et al. 2015). La regulación de la autofagia mediada por lípidos también puede deberse a cambios en la localización subcelular de distintas clases lipídicas, como por ejemplo, CL (Chu, Ji et al. 2013). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha estudiado la posible activación de autofagia mediante la transferencia de éter lípidos a las membranas de los autofagosomas.

Los astrocitos captaban eLpPC, lo metabolizaban añadiendo un ácido graso generando epPC, y eran capaces de secretar al medio los éter lípidos producidos (figuras 81 y 82). En condiciones de ayuno se incrementaron los procesos de captación del lípido exógeno y de secreción de los lípidos producidos (figuras 81 y 82). Sin embargo, en todas las condiciones ensayadas, los niveles de epPC en el interior de las células permanecieron sin cambios (figura 82), lo que implicaba que la supresión de Parkin no afectaba a la síntesis de éter lípidos, y que los efectos observados sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial en los dos tipos de células al incubar con HG o con eLpPC no se debieron a diferencias en los niveles de esta clase lipídica.

Los éter lípidos producidos presentaban, en condiciones basales, una localización mitocondrial (figura 84) (Kuerschner, Richter et al. 2012) lo que explicaría las funciones mitocondriales, antioxidantes fundamentalmente, asociadas a esta clase lipídica. En condiciones de daño mitocondrial los éter lípidos también presentaban una localización mitocondrial (figura 86). Sin embargo, la retirada de suero provocó un cambio de



## Discusión

localización subcelular de los éter lípidos. Tras 6 horas de ayuno, se observó un patrón circular de estos lípidos, que colocalizó con el marcador lisosomal LAMP1, aunque también se observó parte del marcaje del lípido colocalizando con mitocondrias (figura 84). En estas condiciones no se observó triple co-marcaje entre el lípido, los lisosomas y las mitocondrias, descartando la llegada de los éter lípidos a los lisosomas como parte de las membranas de mitocondrias que estaban siendo degradadas. Estos resultados apuntaban a una transferencia de estos lípidos desde las membranas de las mitocondrias a las de los lisosomas. El coeficiente de colocalización entre los éter lípidos y LAMP1 era mayor en células WT que en células PK KO (figura 84), indicando que los procesos de transferencia lipídica entre estos orgánulos eran dependientes de Parkin.

Con el fin de determinar si la transferencia lipídica entre estos dos orgánulos dependía de autofagia, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia utilizando el marcador de autofagosomas LC3. La existencia de triple co-marcaje al bloquear la degradación lisosomal en ausencia de suero (figura 85) indicaba que la llegada de éter lípidos a la membrana de los lisosomas se llevaba a cabo mediante la transferencia previa de estos lípidos a los autofagosomas. Estos resultados no descartan que se estuviesen produciendo otros mecanismos que mediasen la transferencia lipídica entre las mitocondrias y los lisosomas. Entre estos mecanismos podrían encontrarse la transferencia lipídica mediante contactos entre las mitocondrias y los lisosomas (Todkar, Ilamathi et al. 2017) o la llegada de porciones de membrana mitocondrial a los lisosomas mediante "Mitochondrial Derived Vesicles" (Sugiura, McLelland et al. 2014).

El coeficiente de colocalización entre éter lípidos y LC3 era mayor en las células WT (figura 85) demostrando que existía una alteración de los procesos de transferencia lipídica debidos a la eliminación de Parkin. Esta disfunción de la transferencia lipídica por la supresión de ubiquitinación mediada por Parkin ya ha sido descrita en los MAMs (Schumacher, Choi et al. 2002), aunque harían falta nuevos experimentos (menores tiempos de ayuno con el fin de visualizar los posibles contactos autofagosoma-mitocondria o utilización de la construcción Parkin-GFP para determinar la posible triple-colocalización entre Parkin, autofagosomas y mitocondrias) para corroborar si el mismo efecto está teniendo lugar en la transferencia lipídica entre las mitocondrias y los autofagosomas.

La transferencia de éter lípidos desde las mitocondrias a los autofagosomas en condiciones de ayuno sería análoga a la descrita para PE (Hailey, Rambold et al. 2010). Además, el incremento de éter lípidos en condiciones de ayuno ya se detectó al analizar la composición lipídica de las membranas de los autofagosomas (figura 35). Por último, la transferencia de éter lípidos a las membranas de los autofagosomas y la activación de la autofagia asociada explicarían los incrementos de la actividad autofágica observados tras la adición de HG. La posible implicación de Parkin en la transferencia de éter lípidos entre orgánulos explicaría la ausencia de activación de la autofagia mediada por la incubación con HG en células PK KO.

Por último, se estudiaron los efectos de la incubación con eLpPC sobre la funcionalidad mitocondrial. En condiciones basales, la adición de éter lípidos exógenos incrementó la actividad mitocondrial máxima en células WT (figura 87). Este efecto pudo ser debido a la localización subcelular de los éter lípidos producidos. No se han estudiado

## Discusión

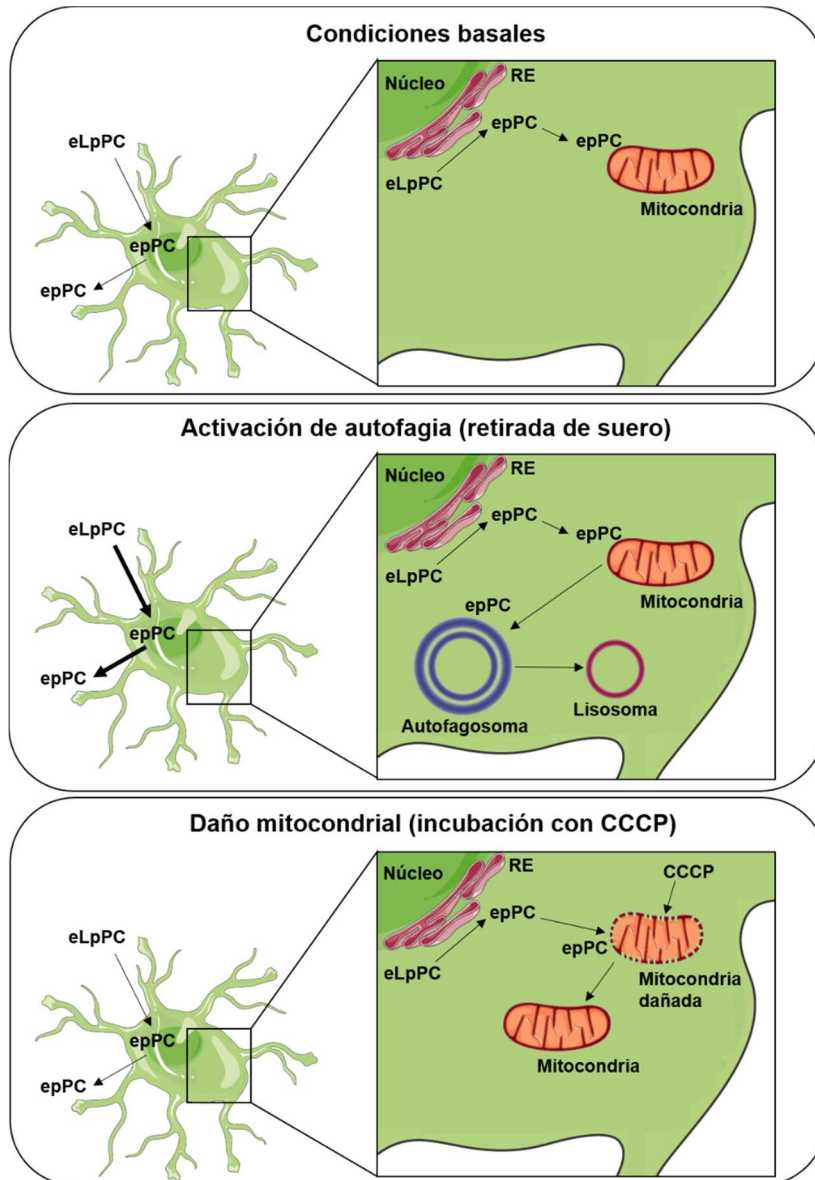
los procesos celulares que causaron este incremento de la actividad mitocondrial, pero el hecho de que no hubiese ningún tipo de cambio en las células PK KO indicaba que la proteína Parkin jugaba algún papel en los mismos. Estos cambios en la actividad mitocondrial en condiciones basales contrastan con la ausencia de efectos tras la estimulación de la síntesis de éter lípidos por incubación con HG (figura 73). Ello pudo deberse a que eLpPC induciría un mayor incremento de éter lípidos ya que era usado exclusivamente para su síntesis, al contrario de lo que ocurría con el HG que era movilizado a otras clases lipídicas. En este sentido, se extrajeron los lípidos de astrocitos WT y PK KO en ausencia o presencia de eLpPC con el fin de determinar el incremento de los niveles de éter lípidos mediante espectrometría de masas, aunque aún no se han recibido los resultados de este análisis.

En condiciones de ayuno, la incubación con eLpPC también incrementó las tasas de actividad máxima en células WT (figura 88) pero no se produjo ningún cambio en la funcionalidad mitocondrial en células PK KO, indicando que el incremento observado era dependiente de la proteína Parkin. En estas condiciones, aunque se detectó lípido exógeno en las mitocondrias, la mayor proporción se encontraba en las membranas de autofagosomas y lisosomas (figuras 84 y 85). Sin embargo, las cantidades de éter lípidos que permanecían en las mitocondrias eran suficientes para inducir aumentos de las tasas máximas de actividad mitocondrial. El incremento de la captación de eLpPC tras la retirada de suero podría aumentar la cantidad total de éter lípidos (considerando la suma de eLpPC y epPC) en el interior de las células (figuras 81 y 82), y favorecer unos niveles elevados de estas clases lipídicas en las membranas de los autofagosomas y las mitocondrias capaces de incrementar la actividad autofágica y la actividad mitocondrial.

Por último, en condiciones de daño mitocondrial la suplementación con eLpPC aumentó la actividad mitocondrial máxima en células WT, y en células PK KO solo cuando se co-incubaban eLpPC y CCCP (figura 89). Estos efectos serían debidos a la localización mitocondrial de los éter lípidos producidos. En el caso de las células WT, los incrementos podrían estar mediados por los mismos procesos dependientes de Parkin que tenían lugar en condiciones basales y en ausencia de suero. Sin embargo, en las células PK KO la incubación simultánea de eLpPC y CCCP activaría procesos independientes de Parkin, y distintos de los que tenían lugar en células WT, que eran capaces de aumentar la actividad mitocondrial en estas células. La modulación de la respiración mitocondrial máxima en células PK KO contrasta con la ausencia de cambios en este parámetro tras la incubación con HG. Esta diferencia pudo ser debida a los mayores niveles de éter lípidos producidos, y localizados en la mitocondria, en presencia de eLpPC.

Como resumen, se muestran en la figura 92 los cambios en la localización subcelular y los efectos sobre la autofagia y la actividad mitocondrial de los éter lípidos producidos por la adición de eLpPC. La incubación de astrocitos con éter lípidos exógenos permitió demostrar que los efectos del incremento de esta clase lipídica sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial eran debidos a cambios en la localización subcelular de los mismos. La activación de autofagia observada en astrocitos WT en presencia de HG y retirada de suero era debida a la movilización de éter lípidos a las membranas de los autofagosomas y los lisosomas en un proceso dependiente de la proteína Parkin.

## Discusión



**Figura 92: Efectos de la suplementación con éter lipídicos exógenos sobre la autofagia y la funcionalidad mitocondrial.** Los astrocitos captan y metabolizan los éter lipídicos exógenos y secretan los lípidos producidos. En presencia de suero los lípidos exógenos se localizan en la mitocondria. La retirada de suero aumenta la captación de eLpPC y la secreción de epPC. Además, se produce transferencia de estos lípidos a las membranas de autofagosomas y lisosomas. En presencia de CCCP los lípidos se localizan en la mitocondria revirtiendo algunos de los efectos deletéreos causados por este compuesto.

## **VII – Conclusiones**



### VII – Conclusiones

1. La activación de autofagia, el envejecimiento y la ausencia de Parkin inducen alteraciones de la composición lipídica de las membranas de los autofagosomas. Se producen variaciones en los niveles de fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) que se correlacionan con cambios en PSD, de plasmalógenos, lisofosfolípidos y esfingolípidos.
2. El envejecimiento y la eliminación de Parkin alteran la composición lipídica de las membranas mitocondriales. Los cambios en lisofosfolípidos y en ceramidas son distintos a los obtenidos en las membranas de autofagosomas apuntando a una regulación de la composición lipídica orgánulo dependiente. Los cambios en lisofosfolípidos podrían ser causados por alteraciones de la actividad de fosfolipasas mientras que los obtenidos para ceramidas apuntan a cambios en la actividad de ceramida sintasas.
3. La supresión de Parkin induce alteraciones de la autofagia en condiciones basales y tras la retirada de suero. La estimulación de la síntesis de éter lípidos incrementa la actividad autofágica de astrocitos en cultivo en condiciones de ayuno. Ante una situación de daño mitocondrial, el incremento de los niveles de éter lípidos revierte las alteraciones sobre la funcionalidad mitocondrial. Estos dos procesos son dependientes de la proteína Parkin.
4. Los astrocitos en cultivo son capaces de captar y metabolizar éter lípidos exógenos, y este proceso se potencia en ausencia de suero. Los éter lípidos exógenos se localizan mayoritariamente en las mitocondrias, pero tras la activación de autofagia se produce una movilización de estos lípidos a las membranas de los autofagosomas y los lisosomas. La funcionalidad mitocondrial se potencia por la suplementación con éter lípidos exógenos. Estos dos procesos son dependientes, al menos en parte, de la proteína Parkin.

### VII – Conclusions

1. Autophagy activation, aging and Parkin loss induce changes in autophagosomal membranes lipidomic composition. There are alterations in phospholipids (phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine) that correlates with changes in PSD levels, plasmalogens, lisophospholipids and sphingolipid levels.
2. Aging and Parkin loss induce mitochondrial membrane lipidomic changes. Changes in lisophospholipids and ceramides are different that the ones observed in autophagosomal membranes pointing to an organelle-dependent lipidomic composition regulation. Changes in lysophospholipids could be a consequence of

## Conclusiones

phospholipase levels modulation and the ones observed in ceramide could be due to ceramide synthase levels/activity changes.

3. Parkin loss induce autophagy alterations in basal and non-serum conditions. Ether lipid synthesis stimulation increase astrocytes autophagic activity in non-serum conditions. In mitochondrial damage conditions increase of ether lipid levels reverts alterations of mitochondrial functionality. These processes are Parkin dependent.
4. Cultured astrocytes uptake and metabolize exogenous ether lipids, and serum retrieval upregulate these processes. Exogenous ether lipid localize in mitochondria and autophagy activation induce a mobilization to autophagosomal and lysosomal membranes. Mitochondrial functionality is upregulated in presence of exogenous ether lipids. These processes are dependent of Parkin.

## **VIII - Bibliografía**





## Bibliografia

- Abbott, S. K., A. M. Jenner, A. S. Spiro, M. Batterham, G. M. Halliday and B. Garner (2015). "Fatty acid composition of the anterior cingulate cortex indicates a high susceptibility to lipid peroxidation in Parkinson's disease." J Parkinsons Dis **5**(1): 175-185.
- Abbott, S. K., H. Li, S. S. Munoz, B. Knoch, M. Batterham, K. E. Murphy, G. M. Halliday and B. Garner (2014). "Altered ceramide acyl chain length and ceramide synthase gene expression in Parkinson's disease." Mov Disord **29**(4): 518-526.
- Aflaki, E., W. Westbroek and E. Sidransky (2017). "The Complicated Relationship between Gaucher Disease and Parkinsonism: Insights from a Rare Disease." Neuron **93**(4): 737-746.
- Aishima, S., N. Fujita, Y. Mano, T. Iguchi, A. Taketomi, Y. Maehara, Y. Oda and M. Tsuneyoshi (2010). "p62+ Hyaline inclusions in intrahepatic cholangiocarcinoma associated with viral hepatitis or alcoholic liver disease." Am J Clin Pathol **134**(3): 457-465.
- Al Rawi, S., S. Louvet-Vallee, A. Djeddi, M. Sachse, E. Culetto, C. Hajjar, L. Boyd, R. Legouis and V. Galy (2011). "Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission." Science **334**(6059): 1144-1147.
- Alecu, I. and S. A. L. Bennett (2019). "Dysregulated Lipid Metabolism and Its Role in alpha-Synucleinopathy in Parkinson's Disease." Front Neurosci **13**: 328.
- Alegre-Abarrategui, J., H. Christian, M. M. Lufino, R. Mutihac, L. L. Venda, O. Ansorge and R. Wade-Martins (2009). "LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model." Hum Mol Genet **18**(21): 4022-4034.
- Alirezai, M., C. C. Kemball, C. T. Flynn, M. R. Wood, J. L. Whitton and W. B. Kiosses (2010). "Short-term fasting induces profound neuronal autophagy." Autophagy **6**(6): 702-710.
- Allen, N. J. and D. A. Lyons (2018). "Glia as architects of central nervous system formation and function." Science **362**(6411): 181-185.
- Andres-Mateos, E., C. Perier, L. Zhang, B. Blanchard-Fillion, T. M. Greco, B. Thomas, H. S. Ko, M. Sasaki, H. Ischiropoulos, S. Przedborski, T. M. Dawson and V. L. Dawson (2007). "DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14807-14812.
- Ansari, M. Y., N. M. Khan, I. Ahmad and T. M. Haqqi (2018). "Parkin clearance of dysfunctional mitochondria regulates ROS levels and increases survival of human chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **26**(8): 1087-1097.
- Appelmans, F. and C. De Duve (1955). "Tissue fractionation studies. 3. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles." Biochem J **59**(3): 426-433.
- Ashkenazi, A., C. F. Bento, T. Ricketts, M. Vicinanza, F. Siddiqi, M. Pavel, F. Squitieri, M. C. Hardenberg, S. Imarisio, F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2017). "Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy." Nature **545**(7652): 108-111.
- Ashrafi, G. and T. L. Schwarz (2013). "The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria." Cell Death Differ **20**(1): 31-42.

## Bibliografia

- Avin-Wittenberg, T., K. Bajdzienko, G. Wittenberg, S. Alseekh, T. Tohge, R. Bock, P. Giavalisco and A. R. Fernie (2015). "Global analysis of the role of autophagy in cellular metabolism and energy homeostasis in Arabidopsis seedlings under carbon starvation." Plant Cell **27**(2): 306-322.
- Badawy, S. M. M., T. Okada, T. Kajimoto, M. Hirase, S. A. Matovelo, S. Nakamura, D. Yoshida, T. Ijuin and S. I. Nakamura (2018). "Extracellular alpha-synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G-protein signaling." J Biol Chem **293**(21): 8208-8216.
- Balakrishnan, S., H. Goodwin and J. N. Cumings (1961). "The distribution of phosphorus-containing lipid compounds in the human brain." J Neurochem **8**: 276-284.
- Barbero-Camps, E., V. Roca-Agujetas, I. Bartolessis, C. de Dios, J. C. Fernandez-Checa, M. Mari, A. Morales, T. Hartmann and A. Colell (2018). "Cholesterol impairs autophagy-mediated clearance of amyloid beta while promoting its secretion." Autophagy **14**(7): 1129-1154.
- Barcena, C., P. M. Quiros, S. Durand, P. Mayoral, F. Rodriguez, X. M. Caravia, G. Marino, C. Garabaya, M. T. Fernandez-Garcia, G. Kroemer, J. M. P. Freije and C. Lopez-Otin (2018). "Methionine Restriction Extends Lifespan in Progeroid Mice and Alters Lipid and Bile Acid Metabolism." Cell Rep **24**(9): 2392-2403.
- Bejarano, E. and J. A. Rodriguez-Navarro (2015). "Autophagy and amino acid metabolism in the brain: implications for epilepsy." Amino Acids **47**(10): 2113-2126.
- Bento, C. F., M. Renna, G. Ghislat, C. Puri, A. Ashkenazi, M. Vicinanza, F. M. Menzies and D. C. Rubinsztajn (2016). "Mammalian Autophagy: How Does It Work?" Annu Rev Biochem **85**: 685-713.
- Bergan, J., T. Skotland, T. Sylvanne, H. Simolin, K. Ekroos and K. Sandvig (2013). "The ether lipid precursor hexadecylglycerol causes major changes in the lipidome of HEp-2 cells." PLoS One **8**(9): e75904.
- Berman, A. Y., R. A. Motechin, M. Y. Wiesenfeld and M. K. Holz (2017). "The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials." NPJ Precis Oncol **1**.
- Bertholet, A. M., T. Delerue, A. M. Millet, M. F. Moulis, C. David, M. Daloyau, L. Arnaune-Pelloquin, N. Davezac, V. Mils, M. C. Miquel, M. Rojo and P. Belenguer (2016). "Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity." Neurobiol Dis **90**: 3-19.
- Bleijerveld, O. B., J. F. Brouwers, A. B. Vaandrager, J. B. Helms and M. Houweling (2007). "The CDP-ethanolamine pathway and phosphatidylserine decarboxylation generate different phosphatidylethanolamine molecular species." J Biol Chem **282**(39): 28362-28372.
- Booth, H. D. E., W. D. Hirst and R. Wade-Martins (2017). "The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis." Trends Neurosci **40**(6): 358-370.
- Bourque, M., L. Gregoire and T. Di Paolo (2018). "The plasmalogen precursor analog PPI-1011 reduces the development of L-DOPA-induced dyskinesias in de novo MPTP monkeys." Behav Brain Res **337**: 183-185.
- Braak, H., M. Sastre and K. Del Tredici (2007). "Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease." Acta Neuropathol **114**(3): 231-241.

## Bibliografia

- Braverman, N. E. and A. B. Moser (2012). "Functions of plasmalogen lipids in health and disease." Biochim Biophys Acta **1822**(9): 1442-1452.
- Brites, P., H. R. Waterham and R. J. Wanders (2004). "Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease." Biochim Biophys Acta **1636**(2-3): 219-231.
- Broski, S. M., C. H. Hunt, G. B. Johnson, R. F. Morreale, V. J. Lowe and P. J. Peller (2014). "Structural and functional imaging in parkinsonian syndromes." Radiographics **34**(5): 1273-1292.
- Burda, J. E. and M. V. Sofroniew (2014). "Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease." Neuron **81**(2): 229-248.
- Camargo, N., J. F. Brouwers, M. Loos, D. H. Gutmann, A. B. Smit and M. H. Verheijen (2012). "High-fat diet ameliorates neurological deficits caused by defective astrocyte lipid metabolism." FASEB J **26**(10): 4302-4315.
- Casarejos, M. J., J. Menendez, R. M. Solano, J. A. Rodriguez-Navarro, J. Garcia de Yébenes and M. A. Mena (2006). "Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline." J Neurochem **97**(4): 934-946.
- Casarejos, M. J., R. M. Solano, J. A. Rodriguez-Navarro, A. Gomez, J. Perucho, J. G. Castano, J. Garcia de Yébenes and M. A. Mena (2009). "Parkin deficiency increases the resistance of midbrain neurons and glia to mild proteasome inhibition: the role of autophagy and glutathione homeostasis." J Neurochem **110**(5): 1523-1537.
- Cavallini, G., A. Donati, Z. Gori, M. Pollera and E. Bergamini (2001). "The protection of rat liver autophagic proteolysis from the age-related decline co-varies with the duration of anti-ageing food restriction." Exp Gerontol **36**(3): 497-506.
- Cirnar, M. D., A. Marte, E. Belluzzi, I. Russo, M. Gabrielli, F. Longo, L. Arcuri, L. Murru, L. Bubacco, M. Matteoli, E. Fedele, C. Sala, M. Passafaro, M. Morari, E. Greggio, F. Onofri and G. Piccoli (2014). "LRRK2 kinase activity regulates synaptic vesicle trafficking and neurotransmitter release through modulation of LRRK2 macro-molecular complex." Front Mol Neurosci **7**: 49.
- Conde, M. A., N. P. Alza, P. A. Iglesias Gonzalez, P. G. Scodelaro Bilbao, S. Sanchez Campos, R. M. Uranga and G. A. Salvador (2018). "Phospholipase D1 downregulation by alpha-synuclein: Implications for neurodegeneration in Parkinson's disease." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids **1863**(6): 639-650.
- Cremona, O., G. Di Paolo, M. R. Wenk, A. Luthi, W. T. Kim, K. Takei, L. Daniell, Y. Nemoto, S. B. Shears, R. A. Flavell, D. A. McCormick and P. De Camilli (1999). "Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling." Cell **99**(2): 179-188.
- Croce, K. R. and A. Yamamoto (2019). "A role for autophagy in Huntington's disease." Neurobiol Dis **122**: 16-22.
- Cuervo, A. M. (2011). "Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 535-541.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (1996). "A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes." Science **273**(5274): 501-503.

## Bibliografia

- Cuervo, A. M., L. Stefanis, R. Fredenburg, P. T. Lansbury and D. Sulzer (2004). "Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy." Science **305**(5688): 1292-1295.
- Cullup, T., A. L. Kho, C. Dionisi-Vici, B. Brandmeier, F. Smith, Z. Urry, M. A. Simpson, S. Yau, E. Bertini, V. McClelland, M. Al-Owain, S. Koelker, C. Koerner, G. F. Hoffmann, F. A. Wijburg, A. E. ten Hoedt, R. C. Rogers, D. Manchester, R. Miyata, M. Hayashi, E. Said, D. Soler, P. M. Kroisel, C. Windpassinger, F. M. Filloux, S. Al-Kaabi, J. Hertecant, M. Del Campo, S. Buk, I. Bodi, H. H. Goebel, C. A. Sewry, S. Abbs, S. Mohammed, D. Josifova, M. Gautel and H. Jungbluth (2013). "Recessive mutations in EPG5 cause Vici syndrome, a multisystem disorder with defective autophagy." Nat Genet **45**(1): 83-87.
- Cummins, N., A. Tweedie, S. Zuryn, J. Bertran-Gonzalez and J. Gotz (2019). "Disease-associated tau impairs mitophagy by inhibiting Parkin translocation to mitochondria." EMBO J **38**(3).
- Cha, S. H., Y. R. Choi, C. H. Heo, S. J. Kang, E. H. Joe, I. Jou, H. M. Kim and S. M. Park (2015). "Loss of parkin promotes lipid rafts-dependent endocytosis through accumulating caveolin-1: implications for Parkinson's disease." Mol Neurodegener **10**: 63.
- Chang, C. L., J. J. Liao, W. P. Huang and H. Lee (2007). "Lysophosphatidic acid inhibits serum deprivation-induced autophagy in human prostate cancer PC-3 cells." Autophagy **3**(3): 268-270.
- Chen, D., W. Fan, Y. Lu, X. Ding, S. Chen and Q. Zhong (2012). "A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate." Mol Cell **45**(5): 629-641.
- Chen, X., L. J. Li, X. Y. Zheng, H. Q. Shen and S. Q. Shang (2015). "Isolation of autophagosome subpopulations after induction of autophagy by calcium." Biochem Cell Biol **93**(3): 180-184.
- Chu, C. T., J. Ji, R. K. Dagda, J. F. Jiang, Y. Y. Tyurina, A. A. Kapralov, V. A. Tyurin, N. Yanamala, I. H. Shrivastava, D. Mohammadyani, K. Z. Q. Wang, J. Zhu, J. Klein-Seetharaman, K. Balasubramanian, A. A. Amoscato, G. Borisenko, Z. Huang, A. M. Gusdon, A. Cheikhi, E. K. Steer, R. Wang, C. Baty, S. Watkins, I. Bahar, H. Bayir and V. E. Kagan (2013). "Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells." Nat Cell Biol **15**(10): 1197-1205.
- Dagda, R. K., S. J. Cherra, 3rd, S. M. Kulich, A. Tandon, D. Park and C. T. Chu (2009). "Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission." J Biol Chem **284**(20): 13843-13855.
- Dall'Armi, C., K. A. Devereaux and G. Di Paolo (2013). "The role of lipids in the control of autophagy." Curr Biol **23**(1): R33-45.
- Dall'Armi, C., A. Hurtado-Lorenzo, H. Tian, E. Morel, A. Nezu, R. B. Chan, W. H. Yu, K. S. Robinson, O. Yeku, S. A. Small, K. Duff, M. A. Frohman, M. R. Wenk, A. Yamamoto and G. Di Paolo (2010). "The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy." Nat Commun **1**: 142.
- Damiano, M., C. A. Gautier, A. L. Bulteau, R. Ferrando-Miguel, C. Gouarne, M. G. Paoli, R. Pruss, F. Auchere, C. L'Hermitte-Stead, F. Bouillaud, A. Brice, O. Corti and A. Lombes (2014). "Tissue- and cell-specific mitochondrial defect in Parkin-deficient mice." PLoS One **9**(6): e99898.

## Bibliografia

- Darios, F., O. Corti, C. B. Lucking, C. Hampe, M. P. Muriel, N. Abbas, W. J. Gu, E. C. Hirsch, T. Rooney, M. Ruberg and A. Brice (2003). "Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death." Hum Mol Genet **12**(5): 517-526.
- de Farias, C. C., M. Maes, K. L. Bonifacio, C. C. Bortolasci, A. de Souza Nogueira, F. F. Brinholi, A. K. Matsumoto, M. A. do Nascimento, L. B. de Melo, S. L. Nixdorf, E. L. Lavado, E. G. Moreira and D. S. Barbosa (2016). "Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets." Neurosci Lett **617**: 66-71.
- De Stefanis, D., P. Reffo, G. Bonelli, F. M. Baccino, G. Sala, R. Ghidoni, P. Codogno and C. Isidoro (2002). "Increase in ceramide level alters the lysosomal targeting of cathepsin D prior to onset of apoptosis in HT-29 colon cancer cells." Biol Chem **383**(6): 989-999.
- Deas, E., H. Plun-Favreau, S. Gandhi, H. Desmond, S. Kjaer, S. H. Loh, A. E. Renton, R. J. Harvey, A. J. Whitworth, L. M. Martins, A. Y. Abramov and N. W. Wood (2011). "PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL." Hum Mol Genet **20**(5): 867-879.
- Deng, H., P. Wang and J. Jankovic (2018). "The genetics of Parkinson disease." Ageing Res Rev **42**: 72-85.
- Dick, K. J., M. Eckhardt, C. Paisan-Ruiz, A. A. Alshehhi, C. Proukakis, N. A. Sibtain, H. Maier, R. Sharifi, M. A. Patton, W. Bashir, R. Koul, S. Raeburn, V. Gieselmann, H. Houlden and A. H. Crosby (2010). "Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35)." Hum Mutat **31**(4): E1251-1260.
- Dickson, D. W. (2012). "Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(8).
- Donadio, V., A. Incensi, V. Leta, M. P. Giannoccaro, C. Scaglione, P. Martinelli, S. Capellari, P. Avoni, A. Baruzzi and R. Liguori (2014). "Skin nerve alpha-synuclein deposits: a biomarker for idiopathic Parkinson disease." Neurology **82**(15): 1362-1369.
- Donati, A., G. Cavallini, C. Paradiso, S. Vittorini, M. Pollera, Z. Gori and E. Bergamini (2001). "Age-related changes in the regulation of autophagic proteolysis in rat isolated hepatocytes." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(7): B288-293.
- Dorninger, F., A. Brodde, N. E. Braverman, A. B. Moser, W. W. Just, S. Forss-Petter, B. Brugger and J. Berger (2015). "Homeostasis of phospholipids - The level of phosphatidylethanolamine tightly adapts to changes in ethanolamine plasmalogens." Biochim Biophys Acta **1851**(2): 117-128.
- Dunn, W. A., Jr. (1990). "Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole." J Cell Biol **110**(6): 1923-1933.
- Ebrahimi-Fakhari, D., A. Saffari, L. Wahlster, J. Lu, S. Byrne, G. F. Hoffmann, H. Jungbluth and M. Sahin (2016). "Congenital disorders of autophagy: an emerging novel class of inborn errors of neuro-metabolism." Brain **139**(Pt 2): 317-337.
- Edvardson, S., H. Hama, A. Shaag, J. M. Grom, I. Berger, D. Soffer, S. H. Korman, I. Taustein, A. Saada and O. Elpeleg (2008). "Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia." Am J Hum Genet **83**(5): 643-648.

## Bibliografia

- Eiyama, A. and K. Okamoto (2015). "PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells." Curr Opin Cell Biol **33**: 95-101.
- Elbaz, A. and C. Tranchant (2007). "Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease." J Neurol Sci **262**(1-2): 37-44.
- Epple, U. D., I. Suriapranata, E. L. Eskelinen and M. Thumm (2001). "Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole." J Bacteriol **183**(20): 5942-5955.
- Erustes, A. G., F. Y. Stefani, J. Y. Terashima, R. S. Stilhano, P. T. Monteforte, G. J. da Silva Pereira, S. W. Han, A. K. Calgarotto, Y. T. Hsu, R. P. Ureshino, C. Bincoletto and S. S. Smaili (2018). "Overexpression of alpha-synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis." J Neurosci Res **96**(1): 160-171.
- Eulenburg, V. and J. Gomeza (2010). "Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function." Brain Res Rev **63**(1-2): 103-112.
- Fabelo, N., V. Martin, G. Santpere, R. Marin, L. Torrent, I. Ferrer and M. Diaz (2011). "Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease." Mol Med **17**(9-10): 1107-1118.
- Farooqui, A. A. and L. A. Horrocks (2001). "Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia." Neuroscientist **7**(3): 232-245.
- Farooqui, A. A., H. C. Yang and L. A. Horrocks (1995). "Plasmalogens, phospholipases A2 and signal transduction." Brain Res Brain Res Rev **21**(2): 152-161.
- Fellner, L., K. A. Jellinger, G. K. Wenning and N. Stefanova (2011). "Glial dysfunction in the pathogenesis of alpha-synucleinopathies: emerging concepts." Acta Neuropathol **121**(6): 675-693.
- Ferese, R., S. Scala, F. Biagioni, E. Giardina, S. Zampatti, N. Modugno, C. Colonnese, M. Storto, F. Fornai, G. Novelli, S. Ruggieri and S. Gambardella (2018). "Heterozygous PLA2G6 Mutation Leads to Iron Accumulation Within Basal Ganglia and Parkinson's Disease." Front Neurol **9**: 536.
- Filimonenko, M., P. Isakson, K. D. Finley, M. Anderson, H. Jeong, T. J. Melia, B. J. Bartlett, K. M. Myers, H. C. Birkeland, T. Lamark, D. Krainc, A. Brech, H. Stenmark, A. Simonsen and A. Yamamoto (2010). "The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy." Mol Cell **38**(2): 265-279.
- Filippov, V., M. A. Song, K. Zhang, H. V. Vinters, S. Tung, W. M. Kirsch, J. Yang and P. J. Duerksen-Hughes (2012). "Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases." J Alzheimers Dis **29**(3): 537-547.
- Ford, D. A. and R. W. Gross (1989). "Plasmenylethanolamine is the major storage depot for arachidonic acid in rabbit vascular smooth muscle and is rapidly hydrolyzed after angiotensin II stimulation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3479-3483.
- Fransen, M., C. Lismont and P. Walton (2017). "The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why?" Int J Mol Sci **18**(6).
- Fregno, I. and M. Molinari (2018). "Endoplasmic reticulum turnover: ER-phagy and other flavors in selective and non-selective ER clearance." F1000Res **7**: 454.

## Bibliografia

- Fujino, T., T. Yamada, T. Asada, Y. Tsuboi, C. Wakana, S. Mawatari and S. Kono (2017). "Efficacy and Blood Plasmalogen Changes by Oral Administration of Plasmalogen in Patients with Mild Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial." EBioMedicine **17**: 199-205.
- Fukuo, Y., S. Yamashina, H. Sonoue, A. Arakawa, E. Nakadera, T. Aoyama, A. Uchiyama, K. Kon, K. Ikejima and S. Watanabe (2014). "Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease." Hepatol Res **44**(9): 1026-1036.
- Gaebler, A., R. Milan, L. Straub, D. Hoelper, L. Kuerschner and C. Thiele (2013). "Alkyne lipids as substrates for click chemistry-based in vitro enzymatic assays." J Lipid Res **54**(8): 2282-2290.
- Gaebler, A., A. Penno, L. Kuerschner and C. Thiele (2016). "A highly sensitive protocol for microscopy of alkyne lipids and fluorescently tagged or immunostained proteins." J Lipid Res **57**(10): 1934-1947.
- Galvagnion, C. (2017). "The Role of Lipids Interacting with alpha-Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease." J Parkinsons Dis **7**(3): 433-450.
- Gao, J., S. Qin and C. Jiang (2015). "Parkin-induced ubiquitination of Mff promotes its association with p62/SQSTM1 during mitochondrial depolarization." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **47**(7): 522-529.
- Gao, W., J. H. Kang, Y. Liao, W. X. Ding, A. A. Gambotto, S. C. Watkins, Y. J. Liu, D. B. Stolz and X. M. Yin (2010). "Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment." J Biol Chem **285**(2): 1371-1383.
- Gaposchkin, D. P. and R. A. Zoeller (1999). "Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants." J Lipid Res **40**(3): 495-503.
- Gaudioso, A., P. Garcia-Rozas, M. J. Casarejos, O. Pastor and J. A. Rodriguez-Navarro (2019). "Lipidomic Alterations in the Mitochondria of Aged Parkin Null Mice Relevant to Autophagy." Front Neurosci **13**: 329.
- Ge, L., D. Melville, M. Zhang and R. Schekman (2013). "The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis." Elife **2**: e00947.
- Gegg, M. E. and A. H. V. Schapira (2018). "The role of glucocerebrosidase in Parkinson disease pathogenesis." FEBS J **285**(19): 3591-3603.
- Geisler, S., K. M. Holmstrom, D. Skujat, F. C. Fiesel, O. C. Rothfuss, P. J. Kahle and W. Springer (2010). "PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1." Nat Cell Biol **12**(2): 119-131.
- Gelino, S. and M. Hansen (2012). "Autophagy - An Emerging Anti-Aging Mechanism." J Clin Exp Pathol Suppl **4**.
- Ginsberg, L., S. Rafique, J. H. Xuereb, S. I. Rapoport and N. L. Gershfeld (1995). "Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain." Brain Res **698**(1-2): 223-226.



## Bibliografia

- Glaser, P. E. and R. W. Gross (1994). "Plasmenylethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion." Biochemistry **33**(19): 5805-5812.
- Guedes, L. C., R. B. Chan, M. A. Gomes, V. A. Conceicao, R. B. Machado, T. Soares, Y. Xu, P. Gaspar, J. A. Carrico, R. N. Alcalay, J. J. Ferreira, T. F. Outeiro and G. Miltenberger-Miltenyi (2017). "Serum lipid alterations in GBA-associated Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **44**: 58-65.
- Guenther, G. G., E. R. Peralta, K. R. Rosales, S. Y. Wong, L. J. Siskind and A. L. Edinger (2008). "Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(45): 17402-17407.
- Guzman, M. and C. Blazquez (2001). "Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle?" Trends Endocrinol Metab **12**(4): 169-173.
- Hailey, D. W., A. S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P. K. Kim and J. Lippincott-Schwartz (2010). "Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation." Cell **141**(4): 656-667.
- Halliday, G. M. and C. H. Stevens (2011). "Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease." Mov Disord **26**(1): 6-17.
- Hamasaki, M., N. Furuta, A. Matsuda, A. Nezu, A. Yamamoto, N. Fujita, H. Oomori, T. Noda, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, A. Amano and T. Yoshimori (2013). "Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites." Nature **495**(7441): 389-393.
- Han, X., D. M. Holtzman and D. W. McKeel, Jr. (2001). "Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry." J Neurochem **77**(4): 1168-1180.
- Hanada, T., N. N. Noda, Y. Satomi, Y. Ichimura, Y. Fujioka, T. Takao, F. Inagaki and Y. Ohsumi (2007). "The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy." J Biol Chem **282**(52): 37298-37302.
- Hang, L., J. Thundiyil and K. L. Lim (2015). "Mitochondrial dysfunction and Parkinson disease: a Parkin-AMPK alliance in neuroprotection." Ann N Y Acad Sci **1350**: 37-47.
- Hansen, M., D. C. Rubinsztein and D. W. Walker (2018). "Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms." Nat Rev Mol Cell Biol **19**(9): 579-593.
- Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano and N. Mizushima (2006). "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice." Nature **441**(7095): 885-889.
- Hatcher, J. M., K. D. Pennell and G. W. Miller (2008). "Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective." Trends Pharmacol Sci **29**(6): 322-329.
- Hayakawa, K., E. Esposito, X. Wang, Y. Terasaki, Y. Liu, C. Xing, X. Ji and E. H. Lo (2016). "Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke." Nature **535**(7613): 551-555.

## Bibliografia

- Hayashi-Nishino, M., N. Fujita, T. Noda, A. Yamaguchi, T. Yoshimori and A. Yamamoto (2009). "A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation." Nat Cell Biol **11**(12): 1433-1437.
- Heckmann, B. L. and D. R. Green (2019). "LC3-associated phagocytosis at a glance." J Cell Sci **132**(5).
- Hernandez-Caceres, M. P., L. Toledo-Valenzuela, F. Diaz-Castro, Y. Avalos, P. Burgos, C. Narro, D. Pena-Oyarzun, J. Espinoza-Cacedo, F. Cifuentes-Araneda, F. Navarro-Aguad, C. Riquelme, R. Troncoso, A. Criollo and E. Morselli (2019). "Palmitic Acid Reduces the Autophagic Flux and Insulin Sensitivity Through the Activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the Hypothalamic Neuronal Cell Line N43/5." Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 176.
- Hernandez-Tiedra, S., G. Fabrias, D. Davila, I. J. Salanueva, J. Casas, L. R. Montes, Z. Anton, E. Garcia-Taboada, M. Salazar-Roa, M. Lorente, J. Nylandsted, J. Armstrong, I. Lopez-Valero, C. S. McKee, A. Serrano-Puebla, R. Garcia-Lopez, J. Gonzalez-Martinez, J. L. Abad, K. Hanada, P. Boya, F. Goni, M. Guzman, P. Lovat, M. Jaattela, A. Alonso and G. Velasco (2016). "Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization." Autophagy **12**(11): 2213-2229.
- Hertz, L. and H. R. Zielke (2004). "Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show." Trends Neurosci **27**(12): 735-743.
- Hirsch, E. C., S. Hunot and A. Hartmann (2005). "Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **11 Suppl 1**: S9-S15.
- Ho, C. Y., T. A. Alghamdi and R. J. Botelho (2012). "Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate: no longer the poor PIP2." Traffic **13**(1): 1-8.
- Hong, Z., N. M. Pedersen, L. Wang, M. L. Torgersen, H. Stenmark and C. Raiborg (2017). "PtdIns3P controls mTORC1 signaling through lysosomal positioning." J Cell Biol **216**(12): 4217-4233.
- Honsho, M., Y. Yagita, N. Kinoshita and Y. Fujiki (2008). "Isolation and characterization of mutant animal cell line defective in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase: localization and transport of plasmalogens to post-Golgi compartments." Biochim Biophys Acta **1783**(10): 1857-1865.
- Hsu, P. and Y. Shi (2017). "Regulation of autophagy by mitochondrial phospholipids in health and diseases." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids **1862**(1): 114-129.
- Huth, W., S. Rolle and I. Wunderlich (2002). "Turnover of matrix proteins in mammalian mitochondria." Biochem J **364**(Pt 1): 275-284.
- Igarashi, M., K. Ma, F. Gao, H. W. Kim, S. I. Rapoport and J. S. Rao (2011). "Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex." J Alzheimers Dis **24**(3): 507-517.
- Iguchi, M., Y. Kujuro, K. Okatsu, F. Koyano, H. Kosako, M. Kimura, N. Suzuki, S. Uchiyama, K. Tanaka and N. Matsuda (2013). "Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation." J Biol Chem **288**(30): 22019-22032.

## Bibliografia

- Ilincheta de Boschero, M. G., M. E. Roque, G. A. Salvador and N. M. Giusto (2000). "Alternative pathways for phospholipid synthesis in different brain areas during aging." Exp Gerontol **35**(5): 653-668.
- Ioannou, M.S., J. Jackson, S.-H. Sheu, C.-L. Chang, A. V. Weigel, H. Liu, H. A. Pasolli, C. S. Xu, S. Pang, H. F. Hess, J. Lippincott-Schwartz and Z. Liu (2018). "Neuron-astrocyte metabolic coupling during neuronal stimulation protects against fatty acid toxicity." bioRxiv doi.org/10.1101/465237.
- Itier, J. M., P. Ibanez, M. A. Mena, N. Abbas, C. Cohen-Salmon, G. A. Bohme, M. Laville, J. Pratt, O. Corti, L. Pradier, G. Ret, C. Joubert, M. Periquet, F. Araujo, J. Negroni, M. J. Casarejos, S. Canals, R. Solano, A. Serrano, E. Gallego, M. Sanchez, P. Deneffe, J. Benavides, G. Tremp, T. A. Rooney, A. Brice and J. Garcia de Yebenes (2003). "Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse." Hum Mol Genet **12**(18): 2277-2291.
- Janen, S. B., H. Chaachouay and C. Richter-Landsberg (2010). "Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes." Glia **58**(14): 1766-1774.
- Jang, D. J. and J. A. Lee (2016). "The roles of phosphoinositides in mammalian autophagy." Arch Pharm Res **39**(8): 1129-1136.
- Janikiewicz, J., J. Szymanski, D. Malinska, P. Patalas-Krawczyk, B. Michalska, J. Duszynski, C. Giorgi, M. Bonora, A. Dobrzyn and M. R. Wieckowski (2018). "Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics." Cell Death Dis **9**(3): 332.
- Jeong, H., F. Then, T. J. Melia, Jr., J. R. Mazzulli, L. Cui, J. N. Savas, C. Voisine, P. Paganetti, N. Tanese, A. C. Hart, A. Yamamoto and D. Krainc (2009). "Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation." Cell **137**(1): 60-72.
- Jin, S. M. and R. J. Youle (2013). "The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria." Autophagy **9**(11): 1750-1757.
- Johansson, I., V. T. Monsen, K. Pettersen, J. Mildenerger, K. Misund, K. Kaarniranta, S. Schonberg and G. Bjorkoy (2015). "The marine n-3 PUFA DHA evokes cytoprotection against oxidative stress and protein misfolding by inducing autophagy and NFE2L2 in human retinal pigment epithelial cells." Autophagy **11**(9): 1636-1651.
- Johnson, C. W., T. J. Melia and A. Yamamoto (2012). "Modulating macroautophagy: a neuronal perspective." Future Med Chem **4**(13): 1715-1731.
- Kalia, L. V. and A. E. Lang (2015). "Parkinson's disease." Lancet **386**(9996): 896-912.
- Kane, L. A., M. Lazarou, A. I. Fogel, Y. Li, K. Yamano, S. A. Sarraf, S. Banerjee and R. J. Youle (2014). "PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity." J Cell Biol **205**(2): 143-153.
- Karabiyik, C., M. J. Lee and D. C. Rubinsztein (2017). "Autophagy impairment in Parkinson's disease." Essays Biochem **61**(6): 711-720.

## Bibliografia

- Kaushik, S., U. Bandyopadhyay, S. Sridhar, R. Kiffin, M. Martinez-Vicente, M. Kon, S. J. Orenstein, E. Wong and A. M. Cuervo (2011). "Chaperone-mediated autophagy at a glance." J Cell Sci **124**(Pt 4): 495-499.
- Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2009). "Methods to monitor chaperone-mediated autophagy." Methods Enzymol **452**: 297-324.
- Kaushik, S., A. C. Massey and A. M. Cuervo (2006). "Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy." EMBO J **25**(17): 3921-3933.
- Kawanishi, N., Y. Kato, K. Yokozeki, S. Sawada, R. Sakurai, Y. Fujiwara, S. Shinkai, N. Goda and K. Suzuki (2018). "Effects of aging on serum levels of lipid molecular species as determined by lipidomics analysis in Japanese men and women." Lipids Health Dis **17**(1): 135.
- Kevala, J. H. and H. Y. Kim (2001). "Determination of substrate preference in phosphatidylserine decarboxylation by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry." Anal Biochem **292**(1): 130-138.
- Khattar, N. K., S. Yablonska, S. V. Baranov, O. V. Baranova, E. S. Kretz, T. M. Larkin, D. L. Carlisle, R. M. Richardson and R. M. Friedlander (2016). "Isolation of functionally active and highly purified neuronal mitochondria from human cortex." J Neurosci Methods **263**: 1-6.
- Kiebish, M. A., X. Han, H. Cheng, A. Lunceford, C. F. Clarke, H. Moon, J. H. Chuang and T. N. Seyfried (2008). "Lipidomic analysis and electron transport chain activities in C57BL/6J mouse brain mitochondria." J Neurochem **106**(1): 299-312.
- Kiebish, M. A., X. Han and T. N. Seyfried (2009). "Examination of the brain mitochondrial lipidome using shotgun lipidomics." Methods Mol Biol **579**: 3-18.
- Kim, J., M. Kundu, B. Viollet and K. L. Guan (2011). "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1." Nat Cell Biol **13**(2): 132-141.
- Kim, K. Y., H. J. Jang, Y. R. Yang, K. I. Park, J. Seo, I. W. Shin, T. I. Jeon, S. C. Ahn, P. G. Suh, T. F. Osborne and Y. K. Seo (2016). "SREBP-2/PNPLA8 axis improves non-alcoholic fatty liver disease through activation of autophagy." Sci Rep **6**: 35732.
- Kim, K. Y., M. V. Stevens, M. H. Akter, S. E. Rusk, R. J. Huang, A. Cohen, A. Noguchi, D. Springer, A. V. Bocharov, T. L. Eggerman, D. F. Suen, R. J. Youle, M. Amar, A. T. Remaley and M. N. Sack (2011). "Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells." J Clin Invest **121**(9): 3701-3712.
- Kinghorn, K. J., J. I. Castillo-Quan, F. Bartolome, P. R. Angelova, L. Li, S. Pope, H. M. Cocheme, S. Khan, S. Asghari, K. P. Bhatia, J. Hardy, A. Y. Abramov and L. Partridge (2015). "Loss of PLA2G6 leads to elevated mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction." Brain **138**(Pt 7): 1801-1816.
- Kirkin, V., T. Lamark, T. Johansen and I. Dikic (2009). "NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets." Autophagy **5**(5): 732-733.
- Kirschner, D. A. and A. L. Ganser (1982). "Myelin labeled with mercuric chloride. Asymmetric localization of phosphatidylethanolamine plasmalogen." J Mol Biol **157**(4): 635-658.

## Bibliografia

- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno and N. Shimizu (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." Nature **392**(6676): 605-608.
- Klegeris, A., B. I. Giasson, H. Zhang, J. Maguire, S. Pelech and P. L. McGeer (2006). "Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells." FASEB J **20**(12): 2000-2008.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-1721.
- Koga, H., S. Kaushik and A. M. Cuervo (2010). "Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion." FASEB J **24**(8): 3052-3065.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." Nature **441**(7095): 880-884.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Ueno, J. Iwata, S. Murata, I. Tanida, J. Ezaki, N. Mizushima, Y. Ohsumi, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka and T. Chiba (2005). "Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice." J Cell Biol **169**(3): 425-434.
- Krebs, C. E., S. Karkheiran, J. C. Powell, M. Cao, V. Makarov, H. Darvish, G. Di Paolo, R. H. Walker, G. A. Shahidi, J. D. Buxbaum, P. De Camilli, Z. Yue and C. Paisan-Ruiz (2013). "The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures." Hum Mutat **34**(9): 1200-1207.
- Kubo, S. I. (2016). "Membrane lipids as therapeutic targets for Parkinson's disease: a possible link between Lewy pathology and membrane lipids." Expert Opin Ther Targets **20**(11): 1301-1310.
- Kuda, O., C. M. Jenkins, J. R. Skinner, S. H. Moon, X. Su, R. W. Gross and N. A. Abumrad (2011). "CD36 protein is involved in store-operated calcium flux, phospholipase A2 activation, and production of prostaglandin E2." J Biol Chem **286**(20): 17785-17795.
- Kuerschner, L., D. Richter, H. K. Hannibal-Bach, A. Gaebler, A. Shevchenko, C. S. Ejsing and C. Thiele (2012). "Exogenous ether lipids predominantly target mitochondria." PLoS One **7**(2): e31342.
- Kuerschner, L. and C. Thiele (2014). "Multiple bonds for the lipid interest." Biochim Biophys Acta **1841**(8): 1031-1037.
- Kuma, A., M. Matsui and N. Mizushima (2007). "LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization." Autophagy **3**(4): 323-328.
- Kuroda, Y., T. Mitsui, M. Kunishige, M. Shono, M. Akaike, H. Azuma and T. Matsumoto (2006). "Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells." Hum Mol Genet **15**(6): 883-895.
- Kyrklund, T. and J. Meijer (1994). "Lipid composition of liver peroxisomes isolated from untreated and clofibrate-treated mice and rats." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **109**(4): 665-673.

## Bibliografia

- Law, B. A., X. Liao, K. S. Moore, A. Southard, P. Roddy, R. Ji, Z. Szulc, A. Bielawska, P. C. Schulze and L. A. Cowart (2018). "Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes." FASEB J **32**(3): 1403-1416.
- Ledesma, M. D., A. Prinetti, S. Sonnino and E. H. Schuchman (2011). "Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice." J Neurochem **116**(5): 779-788.
- Lee, A. and R. M. Gilbert (2016). "Epidemiology of Parkinson Disease." Neurol Clin **34**(4): 955-965.
- Lee, H. J., J. E. Suk, C. Patrick, E. J. Bae, J. H. Cho, S. Rho, D. Hwang, E. Masliah and S. J. Lee (2010). "Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies." J Biol Chem **285**(12): 9262-9272.
- Lee, J. H., W. H. Yu, A. Kumar, S. Lee, P. S. Mohan, C. M. Peterhoff, D. M. Wolfe, M. Martinez-Vicente, A. C. Massey, G. Sovak, Y. Uchiyama, D. Westaway, A. M. Cuervo and R. A. Nixon (2010). "Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations." Cell **141**(7): 1146-1158.
- Lee, J. M., S. J. Park and D. S. Im (2015). "Lysophosphatidylethanolamine increases intracellular Ca(2+) through LPA(1) in PC-12 neuronal cells." Biochem Biophys Res Commun **461**(2): 378-382.
- Li, W. W., J. Li and J. K. Bao (2012). "Microautophagy: lesser-known self-eating." Cell Mol Life Sci **69**(7): 1125-1136.
- Liao, P. C., I. R. Boldogh, S. E. Siegmund, Z. Freyberg and L. A. Pon (2018). "Isolation of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae* using magnetic bead affinity purification." PLoS One **13**(4): e0196632.
- Lin, G., P. T. Lee, K. Chen, D. Mao, K. L. Tan, Z. Zuo, W. W. Lin, L. Wang and H. J. Bellen (2018). "Phospholipase PLA2G6, a Parkinsonism-Associated Gene, Affects Vps26 and Vps35, Retromer Function, and Ceramide Levels, Similar to alpha-Synuclein Gain." Cell Metab **28**(4): 605-618 e606.
- Lin, L. F., D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektash and F. Collins (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." Science **260**(5111): 1130-1132.
- Lingwood, D., H. J. Kaiser, I. Levental and K. Simons (2009). "Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 955-960.
- Liu, L., K. Zhang, H. Sandoval, S. Yamamoto, M. Jaiswal, E. Sanz, Z. Li, J. Hui, B. H. Graham, A. Quintana and H. J. Bellen (2015). "Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration." Cell **160**(1-2): 177-190.
- Liu, M., L. Zhou, B. Zhang, M. He, X. Dong, X. Lin, C. Jia, X. Bai, Y. Dai, Y. Su, Z. Zou and H. Zheng (2016). "Elevation of n-3/n-6 PUFAs ratio suppresses mTORC1 and prevents colorectal carcinogenesis associated with APC mutation." Oncotarget **7**(47): 76944-76954.
- Lonskaya, I., M. L. Hebron, N. K. Algarzae, N. Desforjes and C. E. Moussa (2013). "Decreased parkin solubility is associated with impairment of autophagy in the nigrostriatum of sporadic Parkinson's disease." Neuroscience **232**: 90-105.

## Bibliografia

- Lystad, A. H. and A. Simonsen (2016). "Phosphoinositide-binding proteins in autophagy." FEBS Lett **590**(15): 2454-2468.
- MacVicar, T. D., L. V. Mannack, R. M. Lees and J. D. Lane (2015). "Targeted siRNA Screens Identify ER-to-Mitochondrial Calcium Exchange in Autophagy and Mitophagy Responses in RPE1 Cells." Int J Mol Sci **16**(6): 13356-13380.
- Maeba, R., T. Maeda, M. Kinoshita, K. Takao, H. Takenaka, J. Kusano, N. Yoshimura, Y. Takeoka, D. Yasuda, T. Okazaki and T. Teramoto (2007). "Plasmalogens in human serum positively correlate with high-density lipoprotein and decrease with aging." J Atheroscler Thromb **14**(1): 12-18.
- Mancias, J. D., X. Wang, S. P. Gygi, J. W. Harper and A. C. Kimmelman (2014). "Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy." Nature **509**(7498): 105-109.
- Martinez-Lopez, N. and R. Singh (2015). "Autophagy and Lipid Droplets in the Liver." Annu Rev Nutr **35**: 215-237.
- Martinez-Una, M., M. Varela-Rey, A. Cano, L. Fernandez-Ares, N. Beraza, I. Aurrekoetxea, I. Martinez-Arranz, J. L. Garcia-Rodriguez, X. Buque, D. Mestre, Z. Luka, C. Wagner, C. Alonso, R. H. Finnell, S. C. Lu, M. L. Martinez-Chantar, P. Aspichueta and J. M. Mato (2013). "Excess S-adenosylmethionine reroutes phosphatidylethanolamine towards phosphatidylcholine and triglyceride synthesis." Hepatology **58**(4): 1296-1305.
- Martinez-Vicente, M., Z. Talloczy, E. Wong, G. Tang, H. Koga, S. Kaushik, R. de Vries, E. Arias, S. Harris, D. Sulzer and A. M. Cuervo (2010). "Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease." Nat Neurosci **13**(5): 567-576.
- Marzella, L., J. Ahlberg and H. Glaumann (1982). "Isolation of autophagic vacuoles from rat liver: morphological and biochemical characterization." J Cell Biol **93**(1): 144-154.
- McMahon, H. T. and E. Boucrot (2015). "Membrane curvature at a glance." J Cell Sci **128**(6): 1065-1070.
- Mencarelli, C. and P. Martinez-Martinez (2013). "Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough." Cell Mol Life Sci **70**(2): 181-203.
- Menendez, J., J. A. Rodriguez-Navarro, R. M. Solano, M. J. Casarejos, I. Rodal, R. Guerrero, M. P. Sanchez, J. Avila, M. A. Mena and J. G. de Yébenes (2006). "Suppression of Parkin enhances nigrostriatal and motor neuron lesion in mice over-expressing human-mutated tau protein." Hum Mol Genet **15**(13): 2045-2058.
- Menna-Barreto, R. F., K. Salomao, A. P. Dantas, R. M. Santa-Rita, M. J. Soares, H. S. Barbosa and S. L. de Castro (2009). "Different cell death pathways induced by drugs in Trypanosoma cruzi: an ultrastructural study." Micron **40**(2): 157-168.
- Metaxakis, A., C. Ploumi and N. Tavernarakis (2018). "Autophagy in Age-Associated Neurodegeneration." Cells **7**(5).
- Mirza, B., H. Hadberg, P. Thomsen and T. Moos (2000). "The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease." Neuroscience **95**(2): 425-432.

## Bibliografia

- Mizushima, N. (2018). "A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease." Nat Cell Biol **20**(5): 521-527.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." Mol Biol Cell **15**(3): 1101-1111.
- Mizushima, N., T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2011). "The role of Atg proteins in autophagosome formation." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 107-132.
- Moe, H. and O. Behnke (1962). "Cytoplasmic bodies containing mitochondria, ribosomes, and rough surfaced endoplasmic membranes in the epithelium of the small intestine of newborn rats." J Cell Biol **13**: 168-171.
- Monastyrska, I., E. Rieter, D. J. Klionsky and F. Reggiori (2009). "Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy." Biol Rev Camb Philos Soc **84**(3): 431-448.
- Morita, M., H. Ikeshima-Kataoka, M. Kreft, N. Vardjan, R. Zorec and M. Noda (2019). "Metabolic Plasticity of Astrocytes and Aging of the Brain." Int J Mol Sci **20**(4).
- Mukhopadhyay, S., P. P. Naik, P. K. Panda, N. Sinha, D. N. Das and S. K. Bhutia (2016). "Serum starvation induces anti-apoptotic cIAP1 to promote mitophagy through ubiquitination." Biochem Biophys Res Commun **479**(4): 940-946.
- Nair, U., W. L. Yen, M. Mari, Y. Cao, Z. Xie, M. Baba, F. Reggiori and D. J. Klionsky (2012). "A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis." Autophagy **8**(5): 780-793.
- Nakamura, S. and T. Yoshimori (2018). "Autophagy and Longevity." Mol Cells **41**(1): 65-72.
- Narendra, D., A. Tanaka, D. F. Suen and R. J. Youle (2008). "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy." J Cell Biol **183**(5): 795-803.
- Narendra, D. P., S. M. Jin, A. Tanaka, D. F. Suen, C. A. Gautier, J. Shen, M. R. Cookson and R. J. Youle (2010). "PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin." PLoS Biol **8**(1): e1000298.
- Negoita, F., J. Blomdahl, S. Wasserstrom, M. E. Winberg, P. Osmark, S. Larsson, K. G. Stenkula, M. Ekstedt, S. Kechagias, C. Holm and H. A. Jones (2019). "PNPLA3 variant M148 causes resistance to starvation-mediated lipid droplet autophagy in human hepatocytes." J Cell Biochem **120**(1): 343-356.
- Nguyen, M., Y. C. Wong, D. Ysselstein, A. Severino and D. Krainc (2019). "Synaptic, Mitochondrial, and Lysosomal Dysfunction in Parkinson's Disease." Trends Neurosci **42**(2): 140-149.
- Nikoletopoulou, V. and N. Tavernarakis (2012). "Calcium homeostasis in aging neurons." Front Genet **3**: 200.
- Niso-Santano, M., S. A. Malik, F. Pietrocola, J. M. Bravo-San Pedro, G. Marino, V. Cianfanelli, A. Ben-Younes, R. Troncoso, M. Markaki, V. Sica, V. Izzo, K. Chaba, C. Bauvy, N. Dupont, O. Kepp, P. Rockenfeller, H. Wolinski, F. Madeo, S. Lavandro, P. Codogno, F. Harper, G. Pierron, N. Tavernarakis, F. Cecconi, M. C. Maiuri, L. Galluzzi and G. Kroemer (2015). "Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy." EMBO J **34**(8): 1025-1041.



## Bibliografia

- Nixon, R. A. (2013). "The role of autophagy in neurodegenerative disease." Nat Med **19**(8): 983-997.
- Nixon, R. A., J. Wegiel, A. Kumar, W. H. Yu, C. Peterhoff, A. Cataldo and A. M. Cuervo (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." J Neuropathol Exp Neurol **64**(2): 113-122.
- Noda, N. N., K. Satoo, Y. Fujioka, H. Kumeta, K. Ogura, H. Nakatogawa, Y. Ohsumi and F. Inagaki (2011). "Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7." Mol Cell **44**(3): 462-475.
- Noyce, A. J., J. P. Bestwick, L. Silveira-Moriyama, C. H. Hawkes, G. Giovannoni, A. J. Lees and A. Schrag (2012). "Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease." Ann Neurol **72**(6): 893-901.
- O'Rourke, E. J., P. Kuballa, R. Xavier and G. Ruvkun (2013). "omega-6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy." Genes Dev **27**(4): 429-440.
- Obara, K., T. Sekito, K. Niimi and Y. Ohsumi (2008). "The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function." J Biol Chem **283**(35): 23972-23980.
- Ogier-Denis, E., C. Bauvy, F. Cluzeaud, A. Vandewalle and P. Codogno (2000). "Glucose persistence on high-mannose oligosaccharides selectively inhibits the macroautophagic sequestration of N-linked glycoproteins." Biochem J **345 Pt 3**: 459-466.
- Ohsumi, Y. (2001). "Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 211-216.
- Okatsu, K., K. Saisho, M. Shimanuki, K. Nakada, H. Shitara, Y. S. Sou, M. Kimura, S. Sato, N. Hattori, M. Komatsu, K. Tanaka and N. Matsuda (2010). "p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria." Genes Cells **15**(8): 887-900.
- Okatsu, K., M. Uno, F. Koyano, E. Go, M. Kimura, T. Oka, K. Tanaka and N. Matsuda (2013). "A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment." J Biol Chem **288**(51): 36372-36384.
- Orenstein, S. J., S. H. Kuo, I. Tasset, E. Arias, H. Koga, I. Fernandez-Carasa, E. Cortes, L. S. Honig, W. Dauer, A. Consiglio, A. Raya, D. Sulzer and A. M. Cuervo (2013). "Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy." Nat Neurosci **16**(4): 394-406.
- Orsi, A., M. Razi, H. C. Dooley, D. Robinson, A. E. Weston, L. M. Collinson and S. A. Tooze (2012). "Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy." Mol Biol Cell **23**(10): 1860-1873.
- Padman, B. S., M. Bach, G. Lucarelli, M. Prescott and G. Ramm (2013). "The protonophore CCCP interferes with lysosomal degradation of autophagic cargo in yeast and mammalian cells." Autophagy **9**(11): 1862-1875.
- Paltauf, F. (1994). "Ether lipids in biomembranes." Chem Phys Lipids **74**(2): 101-139.
- Pan, P. Y., Y. Zhu, Y. Shen and Z. Yue (2019). "Crosstalk between presynaptic trafficking and autophagy in Parkinson's disease." Neurobiol Dis **122**: 64-71.

## Bibliografia

- Panganamala, R. V., L. A. Horrocks, J. C. Geer and D. G. Cornwell (1971). "Positions of double bonds in the monounsaturated alk-1-enyl groups from the plasmalogens of human heart and brain." Chem Phys Lipids **6**(2): 97-102.
- Pankiv, S., E. A. Alemu, A. Brech, J. A. Bruun, T. Lamark, A. Overvatn, G. Bjorkoy and T. Johansen (2010). "FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport." J Cell Biol **188**(2): 253-269.
- Papinski, D., M. Schuschnig, W. Reiter, L. Wilhelm, C. A. Barnes, A. Maiolica, I. Hansmann, T. Pfaffenwimmer, M. Kijanska, I. Stoffel, S. S. Lee, A. Brezovich, J. H. Lou, B. E. Turk, R. Aebersold, G. Ammerer, M. Peter and C. Kraft (2014). "Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase." Mol Cell **53**(3): 471-483.
- Parkinson, J. (2002). "An essay on the shaking palsy. 1817." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **14**(2): 223-236; discussion 222.
- Parnetti, L., A. Castrioto, D. Chiasserini, E. Persichetti, N. Tambasco, O. El-Agnaf and P. Calabresi (2013). "Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease." Nat Rev Neurol **9**(3): 131-140.
- Parpura, V. and R. Zorec (2010). "Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes." Brain Res Rev **63**(1-2): 83-92.
- Perucho, J., A. Gomez, M. P. Munoz, J. G. de Yebenes, M. A. Mena and M. J. Casarejos (2016). "Trehalose rescues glial cell dysfunction in striatal cultures from HD R6/1 mice at early postnatal development." Mol Cell Neurosci **74**: 128-145.
- Pike, L. J., X. Han, K. N. Chung and R. W. Gross (2002). "Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis." Biochemistry **41**(6): 2075-2088.
- Plotegher, N., L. Bubacco, E. Greggio and L. Civiero (2019). "Ceramides in Parkinson's Disease: From Recent Evidence to New Hypotheses." Front Neurosci **13**: 330.
- Poewe, W., K. Seppi, C. M. Tanner, G. M. Halliday, P. Brundin, J. Volkmann, A. E. Schrag and A. E. Lang (2017). "Parkinson disease." Nat Rev Dis Primers **3**: 17013.
- Pollard, A. K., C. A. Ortori, R. Stoger, D. A. Barrett and L. Chakrabarti (2017). "Mouse mitochondrial lipid composition is defined by age in brain and muscle." Aging (Albany NY) **9**(3): 986-998.
- Pomilio, C., P. Pavia, R. M. Gorjod, A. Vinuesa, A. Alaimo, V. Galvan, M. L. Kotler, J. Beauquis and F. Saravia (2016). "Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in Abeta internalization." Hippocampus **26**(2): 194-210.
- Post, J. A., A. J. Verkleij, B. Roelofsen and J. A. Op de Kamp (1988). "Plasmalogen content and distribution in the sarcolemma of cultured neonatal rat myocytes." FEBS Lett **240**(1-2): 78-82.
- Qu, X., Z. Zou, Q. Sun, K. Luby-Phelps, P. Cheng, R. N. Hogan, C. Gilpin and B. Levine (2007). "Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development." Cell **128**(5): 931-946.

## Bibliografia

- Raben, N., L. Shea, V. Hill and P. Plotz (2009). "Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders." Methods Enzymol **453**: 417-449.
- Rajendran, L. and K. Simons (2005). "Lipid rafts and membrane dynamics." J Cell Sci **118**(Pt 6): 1099-1102.
- Rambold, A. S., S. Cohen and J. Lippincott-Schwartz (2015). "Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics." Dev Cell **32**(6): 678-692.
- Ravikumar, B., K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri and D. C. Rubinsztein (2010). "Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures." Nat Cell Biol **12**(8): 747-757.
- Reddy, P. H., X. Yin, M. Manczak, S. Kumar, J. A. Pradeepkiran, M. Vijayan and A. P. Reddy (2018). "Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **27**(14): 2502-2516.
- Reggiori, F., T. Shintani, U. Nair and D. J. Klionsky (2005). "Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts." Autophagy **1**(2): 101-109.
- Reiss, D., K. Beyer and B. Engelmann (1997). "Delayed oxidative degradation of polyunsaturated diacyl phospholipids in the presence of plasmalogen phospholipids in vitro." Biochem J **323** ( Pt 3): 807-814.
- Ridler, C. (2018). "Parkinson disease: Truncated alpha-synuclein causes mitochondrial toxicity." Nat Rev Neurol **14**(5): 252.
- Rockenfeller, P., D. Carmona-Gutierrez, F. Pietrocola, G. Kroemer and F. Madeo (2016). "Ethanolamine: A novel anti-aging agent." Mol Cell Oncol **3**(1): e1019023.
- Rockenfeller, P., M. Koska, F. Pietrocola, N. Minois, O. Knittelfelder, V. Sica, J. Franz, D. Carmona-Gutierrez, G. Kroemer and F. Madeo (2015). "Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity." Cell Death Differ **22**(3): 499-508.
- Rodemer, C., T. P. Thai, B. Brugger, T. Kaercher, H. Werner, K. A. Nave, F. Wieland, K. Gorgas and W. W. Just (2003). "Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice." Hum Mol Genet **12**(15): 1881-1895.
- Rodriguez-Muela, N. and P. Boya (2012). "Axonal damage, autophagy and neuronal survival." Autophagy **8**(2): 286-288.
- Rodriguez-Navarro, J. A., S. Kaushik, H. Koga, C. Dall'Armi, G. Shui, M. R. Wenk, G. Di Paolo and A. M. Cuervo (2012). "Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(12): E705-714.
- Rubio, I., J. A. Rodriguez-Navarro, C. Tomas-Zapico, C. Ruiz, M. J. Casarejos, J. Perucho, A. Gomez, I. Rodal, J. J. Lucas, M. A. Mena and J. G. de Yebenes (2009). "Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice." Brain Res **1281**: 91-100.
- Rustenbeck, I., H. Eibl and S. Lenzen (1991). "Structural requirements of lysophospholipid-regulated mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport." Biochim Biophys Acta **1069**(1): 99-109.

## Bibliografia

- Samadder, P., R. Bittman, H. S. Byun and G. Arthur (2009). "A glycosylated antitumor ether lipid kills cells via paraptosis-like cell death." Biochem Cell Biol **87**(2): 401-414.
- Sandebring, A., N. Dehvari, M. Perez-Manso, K. J. Thomas, E. Karpilovski, M. R. Cookson, R. F. Cowburn and A. Cedazo-Minguez (2009). "Parkin deficiency disrupts calcium homeostasis by modulating phospholipase C signalling." FEBS J **276**(18): 5041-5052.
- Sandoval, H., P. Thiagarajan, S. K. Dasgupta, A. Schumacher, J. T. Prchal, M. Chen and J. Wang (2008). "Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells." Nature **454**(7201): 232-235.
- Sarkar, S., J. E. Davies, Z. Huang, A. Tunnacliffe and D. C. Rubinsztein (2007). "Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein." J Biol Chem **282**(8): 5641-5652.
- Sarraf, S. A., M. Raman, V. Guarani-Pereira, M. E. Sowa, E. L. Huttlin, S. P. Gygi and J. W. Harper (2013). "Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization." Nature **496**(7445): 372-376.
- Sato, M. and K. Sato (2011). "Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos." Science **334**(6059): 1141-1144.
- Satori, C. P., M. Ramezani, J.S. Koopmeiners, A. F. Meyer, J. A. Rodriguez-Navarro, M. M. Kuhns, T. H. Taylor, C. L. Haynes, J. J. Dalluge and E. A. Arriaga. (2017). " Checkpoints for Preliminary Identification of Small Molecules found Enriched in Autophagosomes and Activated Mast Cell Secretions Analyzed by Comparative UPLC/MS(e)." Anal Methods **9** (1): 46-54.
- Scarlatti, F., C. Bauvy, A. Ventruti, G. Sala, F. Cluzeaud, A. Vandewalle, R. Ghidoni and P. Codogno (2004). "Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1." J Biol Chem **279**(18): 18384-18391.
- Schonfeld, P. and G. Reiser (2013). "Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain." J Cereb Blood Flow Metab **33**(10): 1493-1499.
- Schu, P. V., K. Takegawa, M. J. Fry, J. H. Stack, M. D. Waterfield and S. D. Emr (1993). "Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting." Science **260**(5104): 88-91.
- Schumacher, M. M., J. Y. Choi and D. R. Voelker (2002). "Phosphatidylserine transport to the mitochondria is regulated by ubiquitination." J Biol Chem **277**(52): 51033-51042.
- Sentelle, R. D., C. E. Senkal, W. Jiang, S. Ponnusamy, S. Gencer, S. P. Selvam, V. K. Ramshesh, Y. K. Peterson, J. J. Lemasters, Z. M. Szulc, J. Bielawski and B. Ogretmen (2012). "Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy." Nat Chem Biol **8**(10): 831-838.
- Shin, N., H. Jeong, J. Kwon, H. Y. Heo, J. J. Kwon, H. J. Yun, C. H. Kim, B. S. Han, Y. Tong, J. Shen, T. Hatano, N. Hattori, K. S. Kim, S. Chang and W. Seol (2008). "LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis." Exp Cell Res **314**(10): 2055-2065.
- Sindelar, P. J., Z. Guan, G. Dallner and L. Ernster (1999). "The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation." Free Radic Biol Med **26**(3-4): 318-324.

## Bibliografia

- Singh, R. and A. M. Cuervo (2012). "Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism." Int J Cell Biol **2012**: 282041.
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. M. Cuervo and M. J. Czaja (2009). "Autophagy regulates lipid metabolism." Nature **458**(7242): 1131-1135.
- Sofroniew, M. V. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." Trends Neurosci **32**(12): 638-647.
- Solano, R. M., M. J. Casarejos, A. Gomez, J. Perucho, J. G. de Yébenes and M. A. Mena (2012). "Parkin null cortical neuronal/glial cultures are resistant to amyloid-beta1-42 toxicity: a role for autophagy?" J Alzheimers Dis **32**(1): 57-76.
- Solano, R. M., M. J. Casarejos, J. Menendez-Cuervo, J. A. Rodriguez-Navarro, J. Garcia de Yébenes and M. A. Mena (2008). "Glial dysfunction in parkin null mice: effects of aging." J Neurosci **28**(3): 598-611.
- Solano, R. M., J. Menendez, M. J. Casarejos, J. A. Rodriguez-Navarro, J. Garcia de Yébenes and M. A. Mena (2006). "Midbrain neuronal cultures from parkin mutant mice are resistant to nitric oxide-induced toxicity." Neuropharmacology **51**(2): 327-340.
- Sou, Y. S., I. Tanida, M. Komatsu, T. Ueno and E. Kominami (2006). "Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16." J Biol Chem **281**(6): 3017-3024.
- Sridhar, S., B. Patel, D. Aphkhaava, F. Macian, L. Santambrogio, D. Shields and A. M. Cuervo (2013). "The lipid kinase PI4KIIIbeta preserves lysosomal identity." EMBO J **32**(3): 324-339.
- Stenmark, H. (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 513-525.
- Stichel, C. C., M. Augustin, K. Kuhn, X. R. Zhu, P. Engels, C. Ullmer and H. Lubbert (2000). "Parkin expression in the adult mouse brain." Eur J Neurosci **12**(12): 4181-4194.
- Strokin, M., K. L. Seburn, G. A. Cox, K. A. Martens and G. Reiser (2012). "Severe disturbance in the Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes from mouse models of human infantile neuroaxonal dystrophy with mutated Pla2g6." Hum Mol Genet **21**(12): 2807-2814.
- Sugawara, K., N. N. Suzuki, Y. Fujioka, N. Mizushima, Y. Ohsumi and F. Inagaki (2005). "Structural basis for the specificity and catalysis of human Atg4B responsible for mammalian autophagy." J Biol Chem **280**(48): 40058-40065.
- Sugiura, A., G. L. McLelland, E. A. Fon and H. M. McBride (2014). "A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles." EMBO J **33**(19): 2142-2156.
- Sun, N., R. J. Youle and T. Finkel (2016). "The Mitochondrial Basis of Aging." Mol Cell **61**(5): 654-666.
- Surmacz, C. A., A. R. Poso and G. E. Mortimore (1987). "Regulation of lysosomal fusion during deprivation-induced autophagy in perfused rat liver." Biochem J **242**(2): 453-458.
- Tagliaferro, P., T. Kareva, T. F. Oo, O. Yarygina, N. Kholodilov and R. E. Burke (2015). "An early axonopathy in a hLRRK2(R1441G) transgenic model of Parkinson disease." Neurobiol Dis **82**: 359-371.

## Bibliografia

- Taherbhoy, A. M., S. W. Tait, S. E. Kaiser, A. H. Williams, A. Deng, A. Nourse, M. Hammel, I. Kurinov, C. O. Rock, D. R. Green and B. A. Schulman (2011). "Atg8 transfer from Atg7 to Atg3: a distinctive E1-E2 architecture and mechanism in the autophagy pathway." Mol Cell **44**(3): 451-461.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Gräter, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland and R. Jahn (2006). "Molecular anatomy of a trafficking organelle." Cell **127**(4): 831-846.
- Tanida, I., T. Ueno and E. Kominami (2004). "LC3 conjugation system in mammalian autophagy." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2503-2518.
- Thomas, H. E., Y. Zhang, J. A. Stefely, S. R. Veiga, G. Thomas, S. C. Kozma and C. A. Mercer (2018). "Mitochondrial Complex I Activity Is Required for Maximal Autophagy." Cell Rep **24**(9): 2404-2417 e2408.
- Todkar, K., H. S. Ilamathi and M. Germain (2017). "Mitochondria and Lysosomes: Discovering Bonds." Front Cell Dev Biol **5**: 106.
- Toschi, A., E. Lee, L. Xu, A. Garcia, N. Gadir and D. A. Foster (2009). "Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin." Mol Cell Biol **29**(6): 1411-1420.
- Trempe, J. F., V. Sauve, K. Grenier, M. Seirafi, M. Y. Tang, M. Menade, S. Al-Abdul-Wahid, J. Krett, K. Wong, G. Kozlov, B. Nagar, E. A. Fon and K. Gehring (2013). "Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation." Science **340**(6139): 1451-1455.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **333**(1-2): 169-174.
- Unschuld, P. G., J. Dachsel, F. Darios, A. Kohlmann, E. Casademunt, K. Lehmann-Horn, M. Dichgans, M. Ruberg, A. Brice, T. Gasser and C. B. Lucking (2006). "Parkin modulates gene expression in control and ceramide-treated PC12 cells." Mol Biol Rep **33**(1): 13-32.
- Valadas, J. S., G. Esposito, D. Vandekerckhove, K. Miskiewicz, L. Deaulmerie, S. Raitano, P. Seibler, C. Klein and P. Verstreken (2018). "ER Lipid Defects in Neuropeptidergic Neurons Impair Sleep Patterns in Parkinson's Disease." Neuron **98**(6): 1155-1169 e1156.
- Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M. M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A. R. Bentivoglio, D. G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W. P. Gilks, D. S. Latchman, R. J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger and N. W. Wood (2004). "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1." Science **304**(5674): 1158-1160.
- van Meer, G. and A. I. de Kroon (2011). "Lipid map of the mammalian cell." J Cell Sci **124**(Pt 1): 5-8.
- Van Rompuy, A. S., M. Oliveras-Salva, A. Van der Perren, O. Corti, C. Van den Haute and V. Baekelandt (2015). "Nigral overexpression of alpha-synuclein in the absence of parkin enhances alpha-synuclein phosphorylation but does not modulate dopaminergic neurodegeneration." Mol Neurodegener **10**: 23.

## Bibliografia

- Vance, D. E. (2014). "Phospholipid methylation in mammals: from biochemistry to physiological function." Biochim Biophys Acta **1838**(6): 1477-1487.
- Vance, J. E. (2014). "MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond." Biochim Biophys Acta **1841**(4): 595-609.
- Vance, J. E. (2015). "Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells." Traffic **16**(1): 1-18.
- Vanhauwaert, R., S. Kuenen, R. Masius, A. Bademosi, J. Manetsberger, N. Schoovaerts, L. Bounti, S. Gontcharenko, J. Swerts, S. Vilain, M. Picillo, P. Barone, S. T. Munshi, F. M. de Vrij, S. A. Kushner, N. V. Gounko, W. Mandemakers, V. Bonifati, F. A. Meunier, S. F. Soukup and P. Verstreken (2017). "The SAC1 domain in synaptojanin is required for autophagosome maturation at presynaptic terminals." EMBO J **36**(10): 1392-1411.
- Vila, M., V. Jackson-Lewis, C. Guegan, D. C. Wu, P. Teismann, D. K. Choi, K. Tieu and S. Przedborski (2001). "The role of glial cells in Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **14**(4): 483-489.
- Villa, E., S. Marchetti and J. E. Ricci (2018). "No Parkin Zone: Mitophagy without Parkin." Trends Cell Biol **28**(11): 882-895.
- Visanji, N. P., C. Marras, L. N. Hazrati, L. W. Liu and A. E. Lang (2014). "Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric alpha-synuclein as a Parkinson's disease biomarker." Mov Disord **29**(4): 444-450.
- Wakabayashi, K. and H. Takahashi (2000). "[The mechanism of Lewy body formation in Parkinson's disease]." Nihon Rinsho **58**(10): 2022-2027.
- Wang, Y., M. Martinez-Vicente, U. Kruger, S. Kaushik, E. Wong, E. M. Mandelkow, A. M. Cuervo and E. Mandelkow (2009). "Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing." Hum Mol Genet **18**(21): 4153-4170.
- Waskell, L., D. Koblin and E. Canova-Davis (1982). "The lipid composition of human liver microsomes." Lipids **17**(4): 317-320.
- Wettmarshausen, J. and F. Perocchi (2017). "Isolation of Functional Mitochondria from Cultured Cells and Mouse Tissues." Methods Mol Biol **1567**: 15-32.
- White, A. L., P. Modaff, F. Holland-Morris and R. M. Pauli (2003). "Natural history of rhizomelic chondrodysplasia punctata." Am J Med Genet A **118A**(4): 332-342.
- Wilson, C. J. and J. C. Callaway (2000). "Coupled oscillator model of the dopaminergic neuron of the substantia nigra." J Neurophysiol **83**(5): 3084-3100.
- Winslow, A. R., C. W. Chen, S. Corrochano, A. Acevedo-Arozena, D. E. Gordon, A. A. Peden, M. Lichtenberg, F. M. Menzies, B. Ravikumar, S. Imarisio, S. Brown, C. J. O'Kane and D. C. Rubinsztein (2010). "alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease." J Cell Biol **190**(6): 1023-1037.
- Wong, Y. C. and E. L. Holzbaur (2014). "Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(42): E4439-4448.

## Bibliografia

- Wood, P. L., T. Smith, N. Lane, M. A. Khan, G. Ehrmantraut and D. B. Goodenowe (2011). "Oral bioavailability of the ether lipid plasmalogen precursor, PPI-1011, in the rabbit: a new therapeutic strategy for Alzheimer's disease." Lipids Health Dis **10**: 227.
- Xia, J., N. Psychogios, N. Young and D. S. Wishart (2009). "MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation." Nucleic Acids Res **37**(Web Server issue): W652-660.
- Xiao, B., J. Y. Goh, L. Xiao, H. Xian, K. L. Lim and Y. C. Liou (2017). "Reactive oxygen species trigger Parkin/PINK1 pathway-dependent mitophagy by inducing mitochondrial recruitment of Parkin." J Biol Chem **292**(40): 16697-16708.
- Xilouri, M. and L. Stefanis (2011). "Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders." Expert Rev Mol Med **13**: e8.
- Yamamoto, H., S. Kakuta, T. M. Watanabe, A. Kitamura, T. Sekito, C. Kondo-Kakuta, R. Ichikawa, M. Kinjo and Y. Ohsumi (2012). "Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation." J Cell Biol **198**(2): 219-233.
- Yang, J., X. Han and R. W. Gross (2003). "Identification of hepatic peroxisomal phospholipase A(2) and characterization of arachidonic acid-containing choline glycerophospholipids in hepatic peroxisomes." FEBS Lett **546**(2-3): 247-250.
- Yao, J., Y. Qiu, L. Jia and D. N. Zacks (2018). "Autophagosome immunoisolation from GFP-LC3B mouse tissue." Autophagy: 1-6.
- Yim, Y. I., T. Sun, L. G. Wu, A. Raimondi, P. De Camilli, E. Eisenberg and L. E. Greene (2010). "Endocytosis and clathrin-uncoating defects at synapses of auxilin knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4412-4417.
- Yla-Anttila, P., H. Vihinen, E. Jokitalo and E. L. Eskelinen (2009). "3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum." Autophagy **5**(8): 1180-1185.
- Yu, L., Y. Chen and S. A. Tooze (2018). "Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms." Autophagy **14**(2): 207-215.
- Yu, W. H., A. M. Cuervo, A. Kumar, C. M. Peterhoff, S. D. Schmidt, J. H. Lee, P. S. Mohan, M. Mercken, M. R. Farmery, L. O. Tjernberg, Y. Jiang, K. Duff, Y. Uchiyama, J. Naslund, P. M. Mathews, A. M. Cataldo and R. A. Nixon (2005). "Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease." J Cell Biol **171**(1): 87-98.
- Zambrano, F., S. Fleischer and B. Fleischer (1975). "Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles." Biochim Biophys Acta **380**(3): 357-369.
- Zatloukal, K., S. W. French, C. Stumptner, P. Strnad, M. Harada, D. M. Toivola, M. Cadrin and M. B. Omary (2007). "From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why?" Exp Cell Res **313**(10): 2033-2049.
- Zhang, W., T. Wang, Z. Pei, D. S. Miller, X. Wu, M. L. Block, B. Wilson, W. Zhang, Y. Zhou, J. S. Hong and J. Zhang (2005). "Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease." FASEB J **19**(6): 533-542.



## Bibliografia

Zhu, H., H. Shen, A. K. Sewell, M. Kniazeva and M. Han (2013). "A novel sphingolipid-TORC1 pathway critically promotes postembryonic development in *Caenorhabditis elegans*." Elife **2**: e00429.

Zoeller, R. A., T. J. Grazia, P. LaCamera, J. Park, D. P. Gaposchkin and H. W. Farber (2002). "Increasing plasmalogen levels protects human endothelial cells during hypoxia." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(2): H671-679.

Zoeller, R. A., A. C. Lake, N. Nagan, D. P. Gaposchkin, M. A. Legner and W. Lieberthal (1999). "Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether." Biochem J **338** ( Pt 3): 769-776.

## **IX – Anexo**

Como documento anexo se adjuntan parte de los resultados presentados en este trabajo en formato de publicación en la revista *Frontiers in Neuroscience*.





# Lipidomic Alterations in the Mitochondria of Aged Parkin Null Mice Relevant to Autophagy

Angel Gaudioso<sup>1</sup>, Patricia Garcia-Rozas<sup>1</sup>, Maria Jose Casarejos<sup>2</sup>, Oscar Pastor<sup>3</sup> and Jose Antonio Rodriguez-Navarro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Cellular Neurobiology Laboratory, Neurobiology Department, UCS-UCM, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, Spain, <sup>2</sup> Neuropharmacology Laboratory, Neurobiology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Madrid, Spain, <sup>3</sup> Clinical Biochemistry Department, UCA-CCM, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Veerle Baekelandt,  
KU Leuven, Belgium

### Reviewed by:

Heather Jane Mortiboys,  
The University of Sheffield,  
United Kingdom  
Derek Narendra,  
National Institutes of Health (NIH),  
United States

### \*Correspondence:

Jose Antonio Rodriguez-Navarro  
jose.a.rodriguez@hrc.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Neurodegeneration,  
a section of the journal  
Frontiers in Neuroscience

**Received:** 17 January 2019

**Accepted:** 21 March 2019

**Published:** 24 April 2019

### Citation:

Gaudioso A, Garcia-Rozas P, Casarejos MJ, Pastor O and Rodriguez-Navarro JA (2019) Lipidomic Alterations in the Mitochondria of Aged Parkin Null Mice Relevant to Autophagy. *Front. Neurosci.* 13:329. doi: 10.3389/fnins.2019.00329

Mitochondrial quality control is important in neurological diseases, but in genetic Parkinson's disease caused by mutations in PINK and parkin mitochondrial degradation through autophagy is crucial. Reductions in autophagy and mitophagy are implicated in aging, age related diseases and Parkinson. The parkin null mice (PK-KO) show only a subtle phenotype, apparent with age or with stressors. We have studied the changes in the lipidomic composition of the mitochondrial membranes isolated from the brains of young and old PK-KO mice and compared them to wild type in order to determine possible implications for Parkinson's disease pathology. We observed an increase in the levels of phosphatidylethanolamine in the young PK-KO mice that is lost in the old and correlate to changes in the phosphatidylserine decarboxylase. PK-KO old mice mitochondria showed lower phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol levels and higher levels of some forms of hydroxylated ceramides. Regarding cardiolipins there were changes in the degree of saturation mainly with age. The lipidomic composition discriminates between the study groups using partial least square discriminant analysis. We discuss the relevance of the lipid changes for the autophagic activity, the mitophagy, the mitochondrial activity and the Parkinson's disease pathology in absence of parkin.

**Keywords:** Parkinson, aging, mitochondrial membrane, macroautophagy, mitophagy, PARK2

## INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a prevalent neurodegenerative disease, where genetic and environmental factors contribute to ethiopathology. Different defects are associated with PD pathogenesis, mainly, oxidative stress, mitochondrial failure and accumulation of aberrant proteins due to impairment of the proteasome or the lysosomal systems (Przedborski, 2017).

Among the PD cases due to a genetic cause, mutations in PARK-2 gene are related with early-onset autosomal recessive forms of PD (Kitada et al., 1998; Hattori et al., 2000; Dodson and Guo, 2007). PARK-2 gene encodes parkin, an E3 ubiquitin ligase of the RBR family.

**Abbreviations:** APL, autophagolysosomal vesicles; AV, autophagosomal vesicles; Cer, ceramide; CL, cardiolipin; Cyt, cytosol; dhCer, dihydroceramide; ER, endoplasmic reticulum; HexCer, hexosylceramide; LPC, lysophosphatidyl choline; LPE, lysophosphatidyl ethanolamine; Lys, lysosome; MAM, mitochondrial associated membrane; Mito, mitochondria; PC, phosphatidylcholine; PD, parkinson's disease; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PK-KO, parkin knock-out; PS, phosphatidylserine; PSD, phosphatidylserine decarboxylase; SM, sphingomyelin; TLCL, tetralinoleoyl cardiolipin.

It was first hypothesized that the absence of degradation of specific parkin substrates by the ubiquitin–proteasome and its accumulation cause neurodegeneration (Moore et al., 2003; Klein and Schlossmacher, 2006). Characterization of the PK-KO mouse demonstrated synaptic and mitochondrial function alterations, but the death of substantia nigra neurons characteristic of PD was not evident up to the age of 24 months, meanwhile one of the most striking features of these mice was the problems to gain weight with age (Itier et al., 2003; Rodríguez-Navarro et al., 2007).

A non-neuronal function of parkin was determined when parkin was eliminated in flies (Pesah et al., 2004). These flies showed decreased body mass and defects in flight muscle mitochondria. The role of parkin in mitochondrial homeostasis has gained importance, as aging PK-KO mice also display increased oxidative stress, decreased glutathione and blunted mitochondrial respiration (Rodríguez-Navarro et al., 2007). *In vitro*, parkin translocates to de-energized mitochondria to initiate the degradation of defective mitochondria through autophagy in the process called mitophagy and has been widely implicated in the control of mitochondrial dynamics (Narendra et al., 2008, 2009, 2010).

Mitochondrial membrane lipids are essential for the mitochondrial function. The architecture, activity of respiratory proteins, transport of proteins into the mitochondria, defects in mitochondrial fission and fusion, maintenance of the double membrane structure and curvature, recruitment, amount and activity of proteins (like parkin or LC3-II, autophagosomal marker) and contribution of lipids to other organella through contacts or vesicles largely depend on the mitochondrial lipid composition (Bottinger et al., 2016; Aufschnaiter et al., 2017).

In fact, mitochondria are one of the sources for the formation of autophagosomal membranes (Hailey et al., 2010), mainly after starvation. The origin of the autophagosomal membrane is a matter of intense debate, and the lipids probably come from multiple sources (Molino et al., 2016; Morel and Codogno, 2018). Parkin could have a role in the mitochondrial lipid contribution to the autophagosomal membranes (Hailey et al., 2010; Cook et al., 2014). The exact lipid composition of those membranes is not known, but changes in the nutritional status like starvation or high fat diets affect lysosomal membrane composition and fusion of autophagosomes with Lys (Koga et al., 2010; Rodríguez-Navarro and Cuervo, 2010, 2012; Rodríguez-Navarro et al., 2012).

In addition to the intriguing decrease of age-associated weight gain, PK-KO mice fed with a high fat and cholesterol diet resisted steatohepatitis, and insulin resistance because parkin influences fatty acid uptake and metabolism (Abumrad and Moore, 2011; Kim et al., 2011; Lobasso et al., 2017). Furthermore, a siRNA screen performed in a cellular model of PD has found a link between the master regulator of lipid synthesis SREBF1 and mitophagy, underscoring the importance of lipid alterations on pathogenesis of parkin mediated PD (Ivatt et al., 2014; Ivatt and Whitworth, 2014).

Hence, the lipid composition of the mitochondria in the absence of parkin and the changes due to aging, the main risk factor for developing PD, are of great interest to understand the pathophysiology of PD and to find new targets for its treatment.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

WT and PK-KO male mice from two age groups (young: 2 months; old: 24 months) were used (Itier et al., 2003). All procedures used in animal experiments were in accordance with legislation in Spain (RD 53/2013) and the European Directive (2010/63/EU) and approved by the Ethics Committee of the Ramón y Cajal Hospital, Madrid (ES-280790002001).

### Subcellular Fractionation Protocol

WT and PK-KO mice from two age groups (young: 2 months and old: 24 months) were starved for 6 h, sacrificed by cervical dislocation and their brains were extracted and resuspended in 0.25 M sucrose. For each fractionation protocol three mice brains per experimental group were pooled. Six independent fractionations were performed with the four experimental groups in parallel. Subcellular fractions were isolated following the method described by Marzella et al. (1982). Briefly, the isolation is achieved through a series of centrifugations including a nycodenz-density-gradient centrifugation (50, 26, 24, 20, and 15%) recovering fractions enriched in: autophagosomes at the 15–20% interface, autophagolysosomes at the 20–24% interface, and a Lys fraction was recovered in the 24–26% interface. The organelles were washed in 0.25 M sucrose, centrifuged and the pellets were resuspended in water (with protease and lipase inhibitors) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (Yang et al., 2015).

### Western-Blot

Protein concentration of subcellular fractions isolate was measured by a Pierce BCA Method (Thermo Fisher Scientific #23227). 50  $\mu\text{g}$  of protein were loaded onto 15% PAGE-SDS gels and electrophoresis was performed at a constant voltage of 100 V at  $4^{\circ}\text{C}$ . Transference of proteins was performed at 15 V overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Antibodies used were: autophagosomal marker, anti-LC3 (MBL #PM036); lysosomal markers, anti-LAMP1 (DSHB #1D4B); anti-Cathepsin D (Abcam #ab75852); and mitochondrial markers, anti-VDAC (Cell Signaling #4661); anti-TOM20 (Cell Signaling #13929); anti-Cytochrome C (BD Pharmingen #556432). HRP-conjugated secondary antibodies were from Sigma.

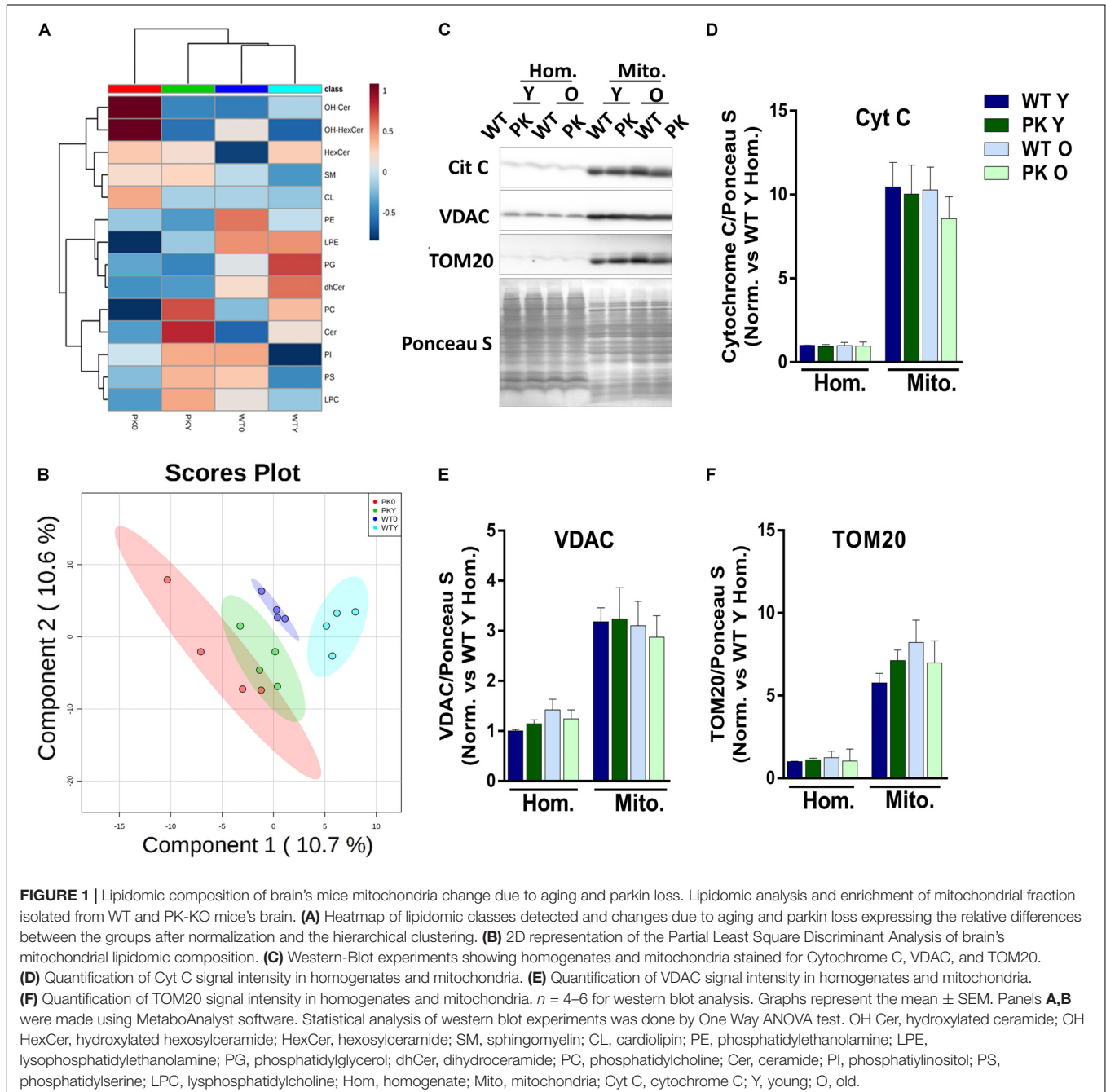
### Lipidomic Analysis

For lipidomic analysis, 500  $\mu\text{g}$  protein mitochondrial samples from WT and PK KO mice brains were centrifuged and resuspended in lysis buffer without detergents (TRIS 50 mM; NaF 5.3 mM; NaCl 125 mM; Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2.35 mM; EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; Protease inhibitors). Lipid extraction was made following the Folch method (Folch et al., 1957). The lipid extract (500  $\mu\text{L}$ ) was split in two equal fractions. One fraction subjected to sphingolipid analysis was saponified with methanolic KOH (1M) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1h to remove phospholipids and the remaining fraction was used for phospholipid analysis.

Phospholipids (PC, PE, and LPC, LPE), and sphingolipids (Cer, HexCer, dhCer, SM) were analyzed using LC-MS/MS. Lipid

species were separated using a Kinetex C18 column (100 Å, 1.7 µm; Phenomenex) at 55°C. A 12-min gradient from 60% solvent 1 (60% acetonitrile in water, 10 mM ammonium formate) to 100% solvent 2 (90% IPA in acetonitrile, 10 mM ammonium formate) followed by 8 min of re-equilibration was applied (flow 0.4 ml/min). Lipids detection was performed on a QTrap 4000 (AB-SCIEX) and analyzed using Analyst version 1.62. Spectra were acquired in the positive ionization mode and nitrogen was used at 500°C. Lipid extracts were dissolved in 250 µL of acetonitrile/IPA (1:1). The injection volume was 2 µL for phospholipids and 5 µL for sphingolipids. Lipids were identified

by LC retention time and the pattern of MS/MS fragmentation (Chamorro et al., 2013; Busto et al., 2018). The analysis of PI, PS, PG, and CL were done by LC-MS/MS, using a Kinetex HILIC column (100 Å, 2.1 mm, 1.7 µm; Phenomenex) at 45°C using a quaternary pump gradient as described in Chamorro et al. (2013). Lipid extracts were dissolved in 100 µL of chloroform and 10 µL were injected in the system. PS species were detected by NLS at *m/z* 185 in positive mode. PI, PG, and CL species were detected by PIS in negative mode at *m/z* 241, 153 and 279.2, respectively. Internal standards used were: PE 32:2 (2500 pmol/sample); PC 28:2 (5000 pmol/sample); PS 28:0 (1000 pmol/sample); PG



34:0 (1000 pmol/sample); PI 38:0 (400 pmol/sample) LPC 17:0 (2500 pmol/sample); LPE 14:0 (1500 pmol/sample); SM 30:1 (2500 pmol/sample); Cer 37:1 (2500 pmol/sample); HexCer 33:1 (2500 pmol/sample); dhCer 35:0 (1000 pmol/sample) and CL 56:0 (200 pmol/sample). All internal standards were purchased from Avanti Polar Lipids and Matreya. Identification, quantitation and annotation of lipid species was done as described (Chamorro et al., 2013; Busto et al., 2018) following the recommendations by Liebisch et al. (2013).

## Statistical Analysis

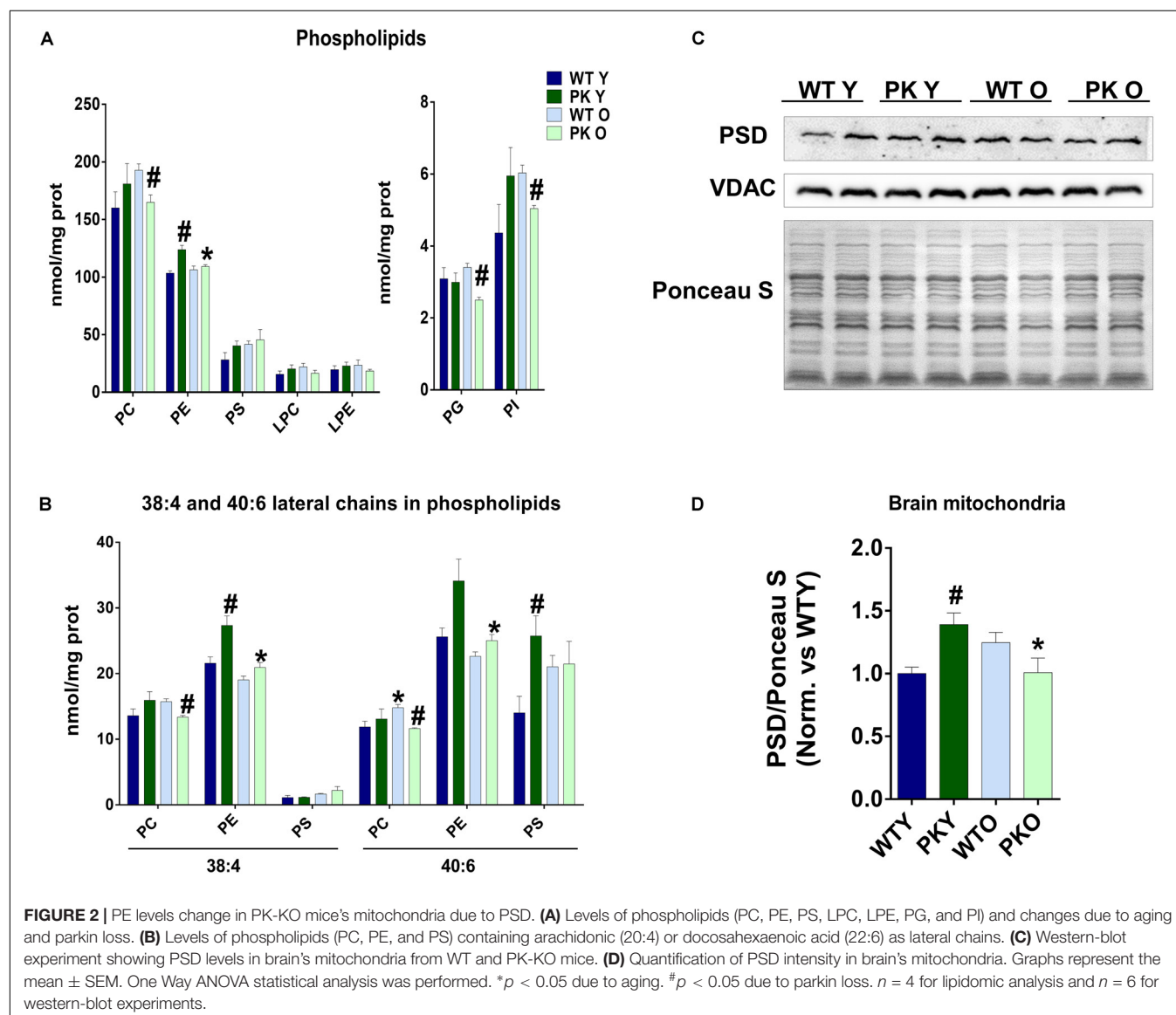
The statistical analysis of the total lipidomic composition of mitochondria was performed using MetaboAnalyst 4.0 software (Xia et al., 2009). The original lipidomic data were subjected to missing value estimation using Probabilistic Principal Component Analysis (PPCA), normalized (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable), analyzed

using partial least square discriminant analysis (PLS-DA) and represented using a heatmap after autoscale samples. All the raw data would be available upon request. For the graph generation and the statistical analysis in the rest of the figures GraphPad Prism and Microsoft Excel were used and One way ANOVA test was performed.

## RESULTS

### Lipidomic Composition of Mitochondrial Membranes Changes With Parkin Deletion and Age

The global analysis of the lipidomic composition of mitochondria is represented in **Figure 1A**. The hierarchical clustering indicated that the most separated mitochondria when we studied the lipid classes were the old PK-KO. They were enriched in





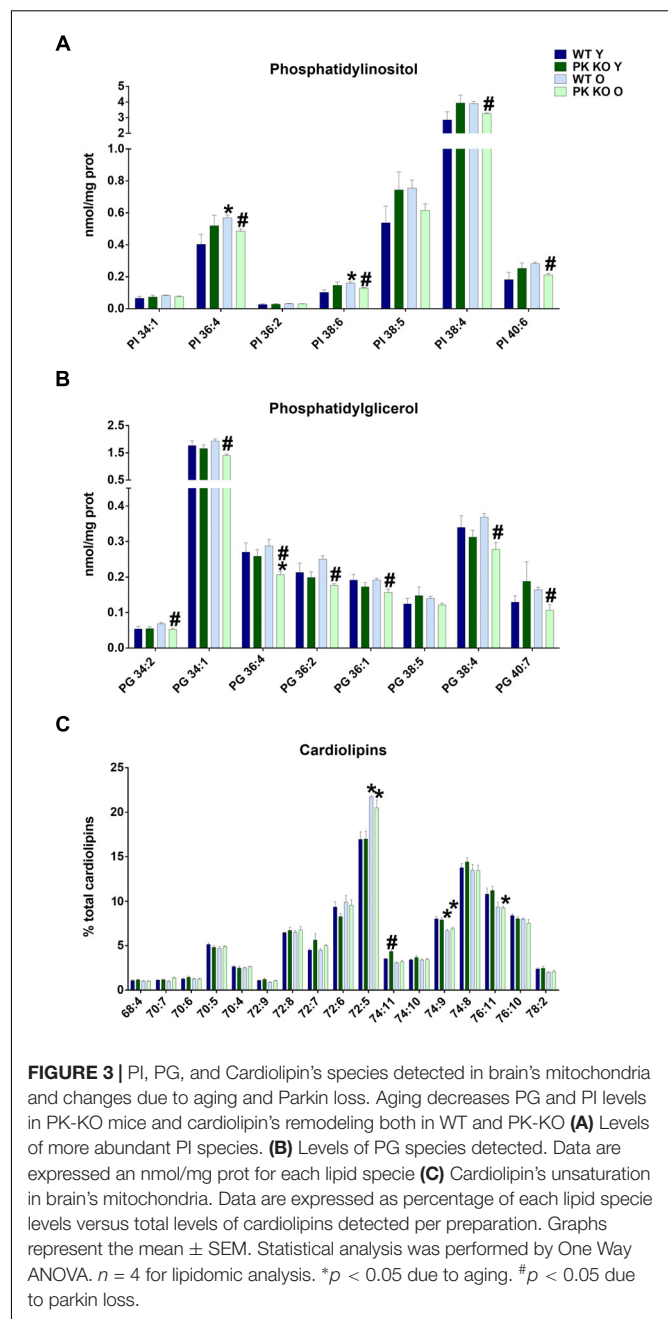
hydroxylated forms of ceramides and presented relatively lower levels of different classes of phospholipids. As described before (Pollard et al., 2017), aging induce differences in the lipidomic composition of brain mitochondrial membranes but the changes induced by parkin elimination were more profound. When we performed partial least square discriminant analysis (PLS-DA) we were able to discriminate between the different groups due to its lipidomic composition (**Figure 1B**). In the **Figures 1C–F** the enrichment in different mitochondrial protein markers could be observed, as well as the lack of differences between WT and PK-KO regardless of the age. Even though Tom20 (Yoshii et al., 2011), cytochrome c (Gama et al., 2015) and VDAC (Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2010) have been described as parkin E3 ubiquitin ligase substrates or key factors for parkin dependent mitophagy, they did not show accumulation in PK-KO mitochondria, not even in 24 months-old animals, meanwhile we observed multiple lipid changes. This result underlines the fact that the changes in lipids are important in the absence of parkin.

### Phosphatidylethanolamine Changes in PK-KO Mice Mitochondria Correlate With PSD

The maintenance of a defined composition of mitochondrial phospholipids relies on the organelle capacity to synthesize CL, PE, PG *in situ* and on the external supply of phosphatidylcholine (PC) and PS, which are exclusively synthesized in the ER and Mitochondrial Associated Membranes (MAM) and must be imported into the mitochondria. One of the most striking changes we found in the phospholipid composition of mitochondria, was the increase in the PE levels in the PK-KO young mice (**Figure 2A**) due mainly to changes in the polyunsaturated forms of PE (**Figure 2B**). In the old PK-KO brain mitochondria, this increase was reversed and there was also less PC. Meanwhile the increase in the PS levels was not significant and the lysophospholipids did not change. PE can be synthesized using: the CDP-ethanolamine-Kennedy pathway; reacylation of lyso-PE via the Lands cycle; phosphatidyl-serine synthase-2; and decarboxylation of PS in the mitochondria by PS decarboxylase (PSD). PSD in addition to be located in the mitochondria, shows preference for the polyunsaturated forms of PS (Kevala and Kim, 2001; Bleijerveld et al., 2007). The levels of PSD enzyme correlate with the changes in PE, they were higher in young PK-KO and decreased with age (**Figures 2C,D**).

### PK-KO Old Mice Mitochondria Show Lower Levels of Phosphatidylglycerol and Phosphatidylinositol

We found that the levels of PI as well as PG decreased in the old PK-KO mitochondria (**Figure 2A**). When we studied the different PI species, we observed a significant decrease in the polyunsaturated species of PI (PI 36:4, 38:4, 38:6, and 40:6 in the **Figure 3A**). Phosphatidylinositol is one of the most important lipids in the process of autophagy initiation, because PI3P is involved in the recruitment of the autophagy machinery, but our



**FIGURE 3 |** PI, PG, and Cardiolipin's species detected in brain's mitochondria and changes due to aging and Parkin loss. Aging decreases PG and PI levels in PK-KO mice and cardiolipin's remodeling both in WT and PK-KO (A) Levels of more abundant PI species. (B) Levels of PG species detected. Data are expressed as nmol/mg prot for each lipid species (C) Cardiolipin's unsaturation in brain's mitochondria. Data are expressed as percentage of each lipid species levels versus total levels of cardiolipins detected per preparation. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by One Way ANOVA.  $n = 4$  for lipidomic analysis. \* $p < 0.05$  due to aging. # $p < 0.05$  due to parkin loss.

technique was unable to differentiate the phosphorylated forms. However, PI3P is rarely found in the mitochondria but is enriched in the mitochondria-ER contacts and in the endosomal system (Gillooly et al., 2000).

Phosphatidylglycerol, contrarily is enriched in the mitochondrial membranes in eukaryotic cells and is the precursor of CL. In this case, all the PG species decreased (**Figure 3B**), including mono unsaturated (34:1 and 36:1), polyunsaturated (36:4 and 38:4) and those with linoleic acyl chain (34:2, 36:2), the main precursor of TLCL. Increasing PG levels by overexpressing an enzyme with lysophosphatidylglycerol acyltransferase or by targeted deletion of ALCAT1 stimulates mitophagy (Zhang et al.,



2014; Hsu and Shi, 2016). The chronic inhibition of mitophagy in PK-KO mice could be a cause or a consequence of the lower levels of the different species of PG we found in old PK-KO mice (**Figure 3B**).

## Maturation of Cardiolipins Decreases With Age

In spite of the lower levels of PG, we did not find any significant differences in the absolute amount of CL due to parkin deletion. However, when we analyzed the acyl chains of CL, we observed in old WT and PK-KO mice a switch to forms with low number of unsaturations (**Figure 3C**). CL maintains membrane potential, architecture of the mitochondrial membrane, and the function of proteins involved in respiration. The unique structure of CL, which contains three glycerol backbones and four fatty acyl chains, makes it key for the mitochondrial function. CL acyl chains are subjected to remodeling by three enzymes: Tafazzin, monolysocardiolipin acyltransferase, and acyl-CoA:lysoCL acyltransferase. Unsaturation of CL causes deficient mitophagy in aging and genetic diseases with mutations in those enzymes, like Barth disease (Hsu and Shi, 2016). Chu et al. (2013) showed that CL remodeling influences LC3-CL direct interaction to alter mitophagy. Specifically, LC3 higher affinity was for TLCL. We did not observe changes in TLCL (72:8), but the increase in the short less unsaturated 72:5 CL forms and the decrease in the long and more unsaturated forms 74:9 and 76:11 (**Figure 3C**) indicated a defect in remodeling with age that could determine mitochondrial activity and autophagy. The enrichment in less unsaturated forms of CL that we found in the old brain mitochondria could represent an attempt to compensate for the loss of mitophagy due to parkin absence.

## PK-KO Old Mice Mitochondria Have Elevated Levels of Specific Forms of Hydroxylated Ceramides

When we studied the changes in sphingolipids in the mitochondrial membranes, where they are minority compared to phospholipids, we did not find mayor changes due to parkin deletion or aging in the different sphingolipid classes (**Figure 4A**). However, some forms of hydroxy-ceramides and of hydroxy-glucosylceramides are enriched in the PK-KO old mice (**Figures 4B,C**), meanwhile long monounsaturated glucosylceramides decreased with age (**Figures 4D,E**). 2-Hydroxy fatty acid sphingolipids biosynthesis requires fatty acid 2-hydroxylase. Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene, FA2H, have been associated with leukodystrophy and spastic paraparesis, underscoring the importance of OH-ceramides in the nervous system. One of hydroxylated fatty acid precursors of OH-ceramides, 2-Hydroxyoleic acid, induces autophagy (Marcilla-Etxenike et al., 2012) and the ceramide involvement in autophagy and apoptosis has been known for a long time. In fact, ceramides as well as cardiolipins have been shown to interact directly with LC3 (Sentelle et al., 2012).

## Starvation-Induced Autophagy Is Not Impaired in Young PK-KO Mice

We have previously described that multiple lipid species including several sphingolipids, gangliosides and ceramides are elevated in autophagic vacuoles and lysosomes from brains of an Alzheimer's disease mouse model (Yang et al., 2015). Using the same fractionation protocol, we studied if there were changes due to parkin deletion. We did not find major changes in the protein markers of autophagosomes, lysosomes or mitochondria due to parkin deletion (**Figures 5A–D**) in the young animals. However, in the **Figure 5A** we observed a shift in the electrophoretic mobility of the LC3 II band in the mitochondrial lines compared with autophagosomes.

## P62 Accumulates in the Homogenates and Autophagosomes but Not in Old PK-KO Mice Lysosomes

We studied the autophagic flux in the brain *in vivo* measuring p62 in the different organelle. Sequestosome p62 is an autophagy adaptor and substrate described to be ubiquitinated by parkin for its degradation via proteasome (Song et al., 2016). In **Figures 6A,B** we observed an accumulation of p62 in the homogenates of PK-KO brains reflecting a lack of degradation, and in the autophagosomal fraction, indicating that it arrives to the autophagic vacuoles after starvation. In the autophagolysosomal and in the lysosomal fractions p62 return to normal levels in the PK-KO old. In order to study lysosomal activity, we measured the levels of the processed form of the cathepsin D (**Figures 6D,E**). We did not find changes in the amount of active cathepsin D with age or increased in the old with PK-KO deletion in the mice brain.

## DISCUSSION

In this work we have shown that mitochondrial lipid composition is altered with parkin deletion and with age in mouse brain. Parkin elimination in mice cause only a subtle phenotype, that worsens with age (Rodriguez-Navarro et al., 2007), stressors (Pickrell et al., 2015; Rojansky et al., 2016) or when the mice are crossed with other pathology generating mutations (Menendez et al., 2006; Rubio et al., 2009; Perucho et al., 2010). Our results indicate that major alterations in the mitochondrial lipids happen in old animals, in fact, the discriminant analysis separate the PK-KO old animals from the rest (**Figure 1A**). We identify specific lipidomic signatures in mitochondria with aging and parkin deletion, revealing mitochondrial brain specific lipid modifying pathways as possible targets to ameliorate age-related mitochondrial defects in absence of parkin.

## Phosphatidylethanolamine and PSD Importance in Autophagy

However, in the young PK-KO mice we found an interesting increase in PE levels in the brain mitochondria similar to the one found by Valadas et al. (2014) in *Drosophila*. They

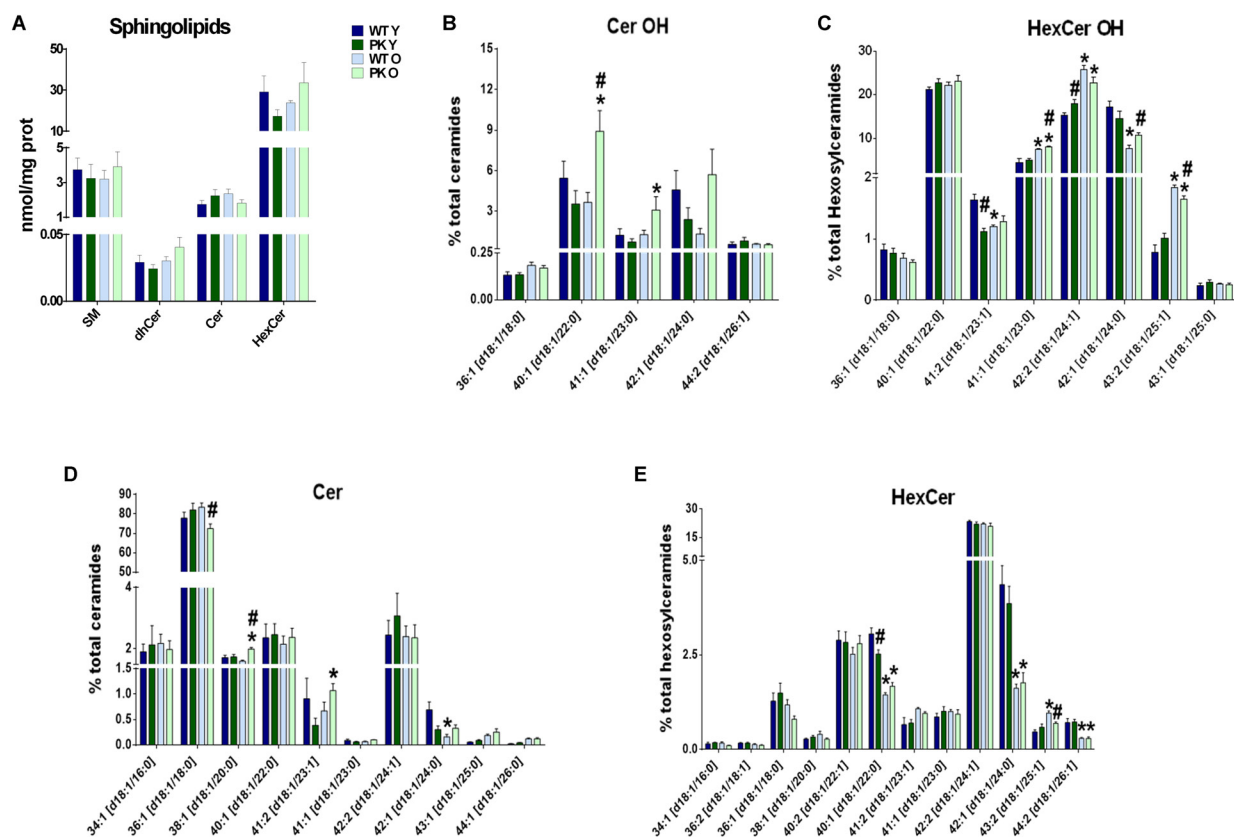
found that mitochondria contained more PS and PE in parkin mutants, whereas the ER of parkin mutants had less PS and PE and interpret that the transfer of PS from ER to mitochondria in parkin mutants is increased. This interpretation fits well with the increase in PSD that we observed in PK-KO mice mitochondria and with the levels of the forms of PS that are PSD substrates (**Figure 2**). PSD is also required for adequate mitochondrial fusion and a reduction in PE impairs fusion of membranes with lipids mimicking mitochondrial composition. PE contribution from the mitochondria to the autophagosomal membranes is important for the elongation of autophagosomes during starvation (Hailey et al., 2010). PSD decrease (as the one we found with aging in PK-KO) impairs LC3 lipidation and the autophagic process, underlying how important mitochondria derived PE is for the autophagosomal membranes. Exogenously added ethanolamine or PE are able to restore autophagy in PSD knockouts, and in control cells both can activate autophagy (Chan and McQuibban, 2012). The increase in PSD we found in the young PK-KO could be responsible for the lack of defects in starvation induced autophagy, meanwhile the decrease of PSD in the old PK-KO could be responsible for the defects observed in p62

accumulation. Modulation of PSD or the levels of PE could be a therapeutic target for PD.

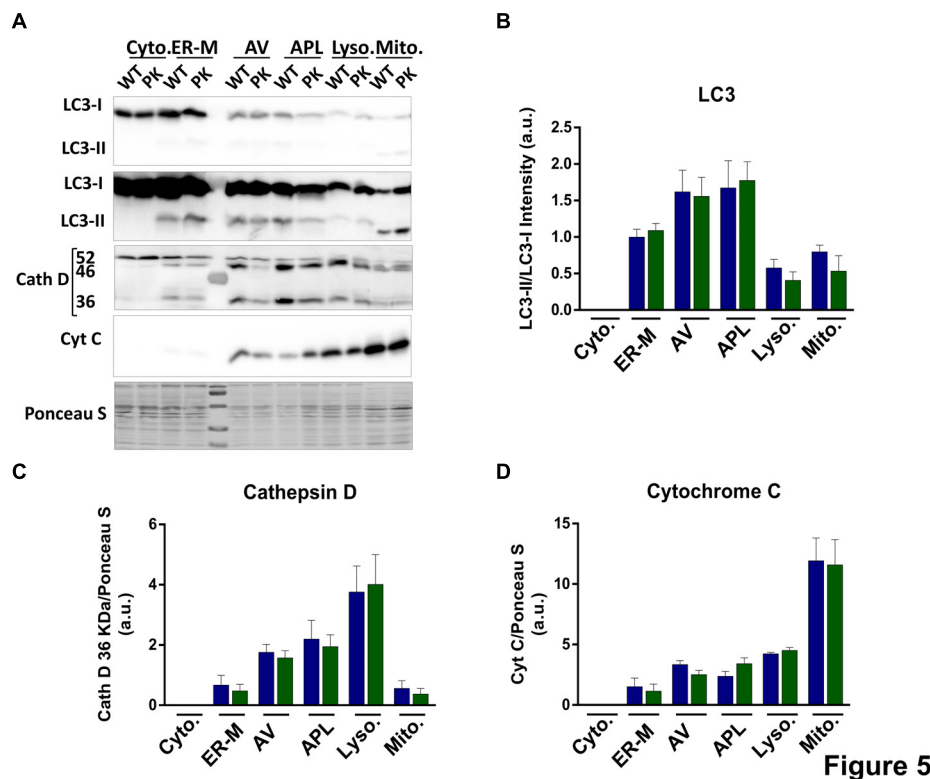
Decreased PE levels were described in the substantia nigra of Parkinson's disease patients compared to control subjects (Riekkinen et al., 1975) before description of genetic forms of the disease. Meanwhile, the activity of Kennedy pathway enzymes was significantly elevated probably to compensate for low levels of PE (Ross et al., 2001). In a study of total cellular lipids from fibroblasts of parkin mutants, using MALDI-TOF and thin-layer chromatography Lobasso et al. found higher levels of gangliosides, and of LPC, PI, and PS, but clearly the total cell lipidome cannot be compared with the mitochondrial-specific changes that we present here (Lobasso et al., 2017).

### Age-Induced Changes in PK-KO Mitochondrial Lipids Relevant for Autophagy and Mitochondrial Function

The main alterations found in the brain mitochondria of PK-KO mice occurred with age, there were lower levels of PC, PG, and PI and more OH-ceramides than in the WT counterparts. Pollard



**FIGURE 4 |** Sphingolipids content in PK-KO mice's brain mitochondria. PK-KO mice's mitochondria have higher levels of hydroxylated ceramides due to aging. **(A)** Levels of different classes of sphingolipids (SM, dhCer, Cer, and HexCer) and changes due to aging and parkin loss. **(B)** Percentage of Hydroxylated ceramide species. **(C)** Percentage of Hydroxylated Hexosyl Ceramide species. **(D)** Percentage of ceramide species. **(E)** Percentage of HexCer species. For panels **B–D** data are expressed as percentage of each lipid specie levels versus total levels of the lipid class analyzed. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by One Way ANOVA test. \* $p < 0.05$  due to aging. # $p < 0.05$  due to Parkin loss.



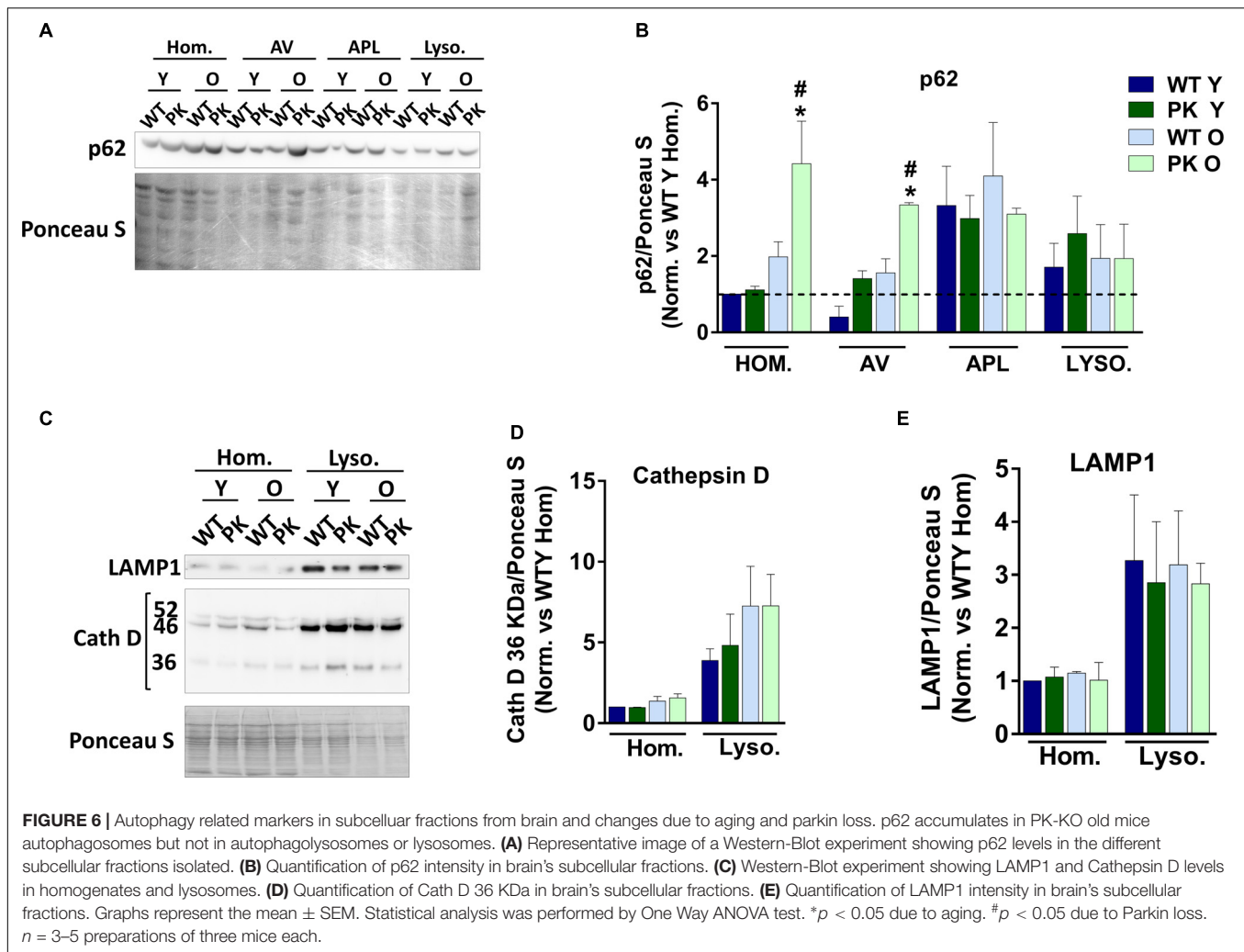
**FIGURE 5 |** Enrichment of autophagosomes, lysosomes and mitochondria from mice's brain. Parkin loss doesn't impair autophagic processes in the young animals. **(A)** Representative images of Western-Blot experiments showing LC3 (LC3-I and LC3-II), (\*higher exposure in the bottom image), Cathepsin D (52, 46, and 36 kDa) and Cytochrome C levels in the different subcellular fractions isolated. **(B)** Quantification of LC3-II/LC3-I ratio. **(C)** Quantification of mature Cath D 36 kDa in brain's subcellular fractions. **(D)** Quantification of Cytochrome C signal intensity in brain's subcellular fractions. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by One Way ANOVA test.  $n = 3$ –5 preparations of three mice each.

et al. have described some changes in mice mitochondria due to aging in mice, focusing in the unsaturation of fatty acids (Pollard et al., 2017). Interestingly we found important differences in the unsaturation of cardiolipins with age in the brain as it happens in the heart (Lee et al., 2006).

Recently, a lysoPG acyltransferase was found to affect mitophagy. Increasing PG by overexpressing this enzyme increased autophagy and deletion of ALCAT1 also increases PG levels and activates mitophagy (Li et al., 2010; Pokorna et al., 2015). The decreased levels of PG that we found in PK-KO old mice could be responsible for a lower mitophagic activity similar to that which happened in PK-KO flies models (Cornelissen et al., 2018), although the study of the role of parkin in mitophagy *in vivo* has rendered conflicting results, depending on age and on the reporters and techniques used (Lee et al., 2017; Cornelissen et al., 2018).

Phosphatidylglycerol is mainly used in mammals mitochondria for CL synthesis (Chen et al., 2018). CL is synthesized from CDP-diacylglycerol and PG without acyl chain specificity and then is remodeled by tafazzin (an enzyme implicated in the Barth Syndrome) adding unsaturated acyl chains through successive transacylation to tetralinoleoyl CL (TLCL). CL remodeling is important for mitophagy and mitochondrial function. We find that the old mitochondria in

the brain have a defect in remodeling (Figure 3C), showing low rates of unsaturation. Appropriate rates of unsaturation are required for optimal respiration in the electron transport chain and to minimize production of ROS (Hsu and Shi, 2016; Chen et al., 2018). When CL is damaged by oxidative stress, as happens with aging, it is remodeled by PLA2 followed by re-acylation by lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT) at the MAMs or in the mitochondria by monolysol acyltransferase. Long and highly unsaturated fatty acyl CL is remodeled by ALCAT. ALCAT also decrease fusion-fission of mitochondrial proteins and inhibits mitophagy because CL oxidation, externalization to the outer membrane and binding to LC3 is required for proper mitophagic activity. LC3 binding to CL depends on the CL acyl chains, and showed greater affinity for TLCL (Chu et al., 2013). It has been described that LC3 interacts with different forms of cardiolipin *in vitro* (Sentelle et al., 2012; Chu et al., 2013; Antón et al., 2016). We observed a change in the LC3 mobility in the brain mitochondria on our samples similar to the one showed before in a mice model of Alzheimer's disease (Yang et al., 2015). This change in mobility could be due to alterations in the processing of LC3, to a conjugation with a different lipid or to posttranslational modifications. *In vitro*, LC3 could be conjugated to PS and ceramides in addition to PE, depending



on pH and interaction with anionic phospholipids (Nakatogawa et al., 2008; Oh-oka et al., 2008). It is tempting to speculate that due to the externalization of cardiolipin and the higher pH in the vicinity of mitochondria, the band shift that we observed *in vivo* could represent a conjugation to a different lipid, namely PS or ceramides. Cardiolipin exposure to the outer membrane not only affects mitophagy, it also modulates  $\alpha$ -synuclein aggregation and affects the electron transport (Ryan et al., 2018).

Regarding sphingolipids in the mitochondrial membranes, some forms of hydroxy-ceramides and of hydroxy-glucosylceramides are enriched in PK-KO old mice. Genetic defects in the biosynthesis and degradation of hydroxy fatty acids cause neurodegenerative diseases. 2-hydroxy sphingolipids biosynthesis requires fatty acid 2-hydroxylase. Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase are associated with hereditary spastic paraparesis, and mutations in lysosomal acid ceramidase (that removes the headgroup from 2-hydroxy sphingolipids in the Lys), cause a lysosomal disorder, Farber's disease (Hama, 2010). Both diseases present autophagic problems and neurodegeneration. In the absence of parkin there is more

oxidative stress (Rodriguez-Navarro et al., 2007) and OH radicals, which could drive the higher formation of these uncommon lipid species in PK-KO old mice.

Relevance of the lipid changes described here on mitophagy *in vivo* is difficult to assess, but with the new mice mitophagy reporter models it could be studied in the future, in spite of the caveats of the model (McWilliams and Ganley, 2019). We have isolated the organelles involved in the process, with a protocol that allow the enrichment in the different subcellular fractions, and we did not find mayor differences for the main organelle markers due to parkin elimination in the young mice (Figure 5). It will be interesting to determine lipidomic changes in the different organelles to study the traffic and activity of the autophagic process in conditions of activation of autophagy or in disease conditions, even though the enrichment of vesicles in the brain present the additional problem of separate the synaptic vesicles.

Contrarily to other markers, with the p62 adaptor we observed an accumulation in the homogenates that is reverted through the autophagic compartments upon starvation (Figure 6). As p62 is a substrate ubiquitinated by parkin for its degradation



via proteasome (Song et al., 2016), it reinforces the idea that in the absence of parkin, starvation-induced autophagy could be upregulated in the young mice, as happened in embryonic neuronal and glial cell cultures (Casarejos et al., 2009), but not in the old ones. The normalization of p62 in the autophagolysosomes and lysosomes could mean that the fusion between AVs and lysosomes is impaired in the old PK-KO mice. Some of the changes that we observe in the old PK-KO mitochondria (less PG and PI and more OH-ceramides) could be present also in the membranes of lysosomes or autophagosomes altering its fusion ability (Koga et al., 2010; Rodriguez-Navarro and Cuervo, 2012).

The lipidomic characterization of the mitochondria, ER, autophagosomes and lysosomes in different conditions would allow us to understand better the lipid trafficking process happening during mitophagy and starvation-induced autophagy in health and disease.

The possible interventions in order to avoid the age related pathology in PK-KO identified in this study include approaches to activate PSD, or to avoid the observed decrease in PG and PI, as well as modifiers of cardiolipin remodeling. In conclusion, we identify here multiple lipid alterations in the absence of parkin that could help us understand the molecular basis of the disease and find new therapeutic targets to stimulate the autophagic process and revert the aggregation of toxic proteins in Parkinson's disease pathology.

## ETHICS STATEMENT

All procedures associated with animal experiments were in accordance with Spanish legislation (RD 53/2013) and the

European Union Council Directive (2010/63/EU) and approved by the Ethics Committee of the Hospital Ramón y Cajal, Madrid (Animal Facilities ES280790002001).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JR-N conceived and designed the experiments. AG, PG-R, and JR-N performed the experiments. JR-N, AG, OP, and MC analyzed the data. OP and MC contributed reagents, materials, analysis tools. JR-N and AG wrote the manuscript. JR-N, AG, OP, and MC revised and edited.

## FUNDING

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (SAF2013-45570 R and SAF 2016-78666 R), the Charles H. Revson Senior Fellows in Biomedical Science Program, and the Miguel Servet I program of the ISCIII (MS13/00234 and CP13/00234), and co-funded with the European Regional Development Fund (ERDF) "A way to achieve Europe" and the European Social Fund (ESF) "The ESF – Investing in your future".

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ana Gomez and Maria Jose Asensio for the technical assistance and Ana Maria Cuervo for her insight and comments.

## REFERENCES

- Abumrad, N. A., and Moore, D. J. (2011). Parkin reinvents itself to regulate fatty acid metabolism by tagging CD36. *J. Clin. Invest.* 121, 3389–3392. doi: 10.1172/JCI59219
- Antón, Z., Landajuela, A., Hervás, J. H., Montes, L. R., Hernández-Tiedra, S., Velasco, G., et al. (2016). Human Atg8-cardiolipin interactions in mitophagy: specific properties of LC3B, GABARAPL2 and GABARAP. *Autophagy* 12, 2386–2403. doi: 10.1080/15548627.2016.1240856
- Aufschneider, A., Kohler, V., Diessl, J., Peselj, C., Carmona-Gutierrez, D., Keller, W., et al. (2017). Mitochondrial lipids in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* 367, 125–140. doi: 10.1007/s00441-016-2463-1
- Bleijerveld, O. B., Brouwers, J. F., Vaandrager, A. B., Helms, J. B., and Houweling, M. (2007). The CDP-ethanolamine pathway and phosphatidylserine decarboxylation generate different phosphatidylethanolamine molecular species. *J. Biol. Chem.* 282, 28362–28372. doi: 10.1074/jbc.M703786200
- Bottinger, L., Ellenrieder, L., and Becker, T. (2016). How lipids modulate mitochondrial protein import. *J. Bioenerg. Biomembr.* 48, 125–135. doi: 10.1007/s10863-015-9599-7
- Busto, R., Serna, J., Perianes-Cachero, A., Quintana-Portillo, R., Garcia-Seisdedos, D., Canfran-Duque, A., et al. (2018). Ellagic acid protects from myelin-associated sphingolipid loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1863, 958–967. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.05.009
- Casarejos, M. J., Solano, R. M., Rodriguez-Navarro, J. A., Gomez, A., Peruchio, J., Castano, J. G., et al. (2009). Parkin deficiency increases the resistance of midbrain neurons and glia to mild proteasome inhibition: the role of autophagy and glutathione homeostasis. *J. Neurochem.* 110, 1523–1537. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06248.x
- Chamorro, L., Garcia-Cano, A., Busto, R., Martinez-Gonzalez, J., Albillos, A., Lasuncion, M. A., et al. (2013). Quantitative profile of lipid classes in blood by normal phase chromatography with evaporative light scattering detector: application in the detection of lipid class abnormalities in liver cirrhosis. *Clin. Chim. Acta* 421, 132–139. doi: 10.1016/j.cca.2013.02.007
- Chan, E. Y., and McQuibban, G. A. (2012). Phosphatidylserine decarboxylase 1 (Psd1) promotes mitochondrial fusion by regulating the biophysical properties of the mitochondrial membrane and alternative topogenesis of mitochondrial genome maintenance protein 1 (Mgm1). *J. Biol. Chem.* 287, 40131–40139. doi: 10.1074/jbc.M112.399428
- Chen, W. W., Chao, Y. J., Chang, W. H., Chan, J. F., and Hsu, Y. H. (2018). Phosphatidylglycerol incorporates into cardiolipin to improve mitochondrial activity and inhibits inflammation. *Sci. Rep.* 8:4919. doi: 10.1038/s41598-018-23190-z
- Chu, C. T., Ji, J., Dagda, R. K., Jiang, J. F., Tyurina, Y. Y., Kapralov, A. A., et al. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat. Cell Biol.* 15, 1197–1205. doi: 10.1038/ncb2837
- Cook, K. L., Soto-Pantoja, D. R., Abu-Asab, M., Clarke, P. A., Roberts, D. D., and Clarke, R. (2014). Mitochondria directly donate their membrane to form autophagosomes during a novel mechanism of parkin-associated mitophagy. *Cell Biosci.* 4:16. doi: 10.1186/2045-3701-4-16
- Cornelissen, T., Vilain, S., Vints, K., Gounko, N., Verstreken, P., and Vandenbergh, W. (2018). Deficiency of parkin and PINK1 impairs age-dependent mitophagy in *Drosophila*. *eLife* 7:e35878. doi: 10.7554/eLife.35878

- Dodson, M. W., and Guo, M. (2007). Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 331–337. doi: 10.1016/j.conb.2007.04.010
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Gama, V., Swahari, V., Schafer, J., Kole, A. J., Evans, A., Huang, Y., et al. (2015). The E3 ligase PARC mediates the degradation of cytosolic cytochrome c to promote survival in neurons and cancer cells. *Sci. Signal.* 7:ra67. doi: 10.1126/scisignal.2005309
- Geisler, S., Holmstrom, K. M., Treis, A., Skujat, D., Weber, S. S., Fiesel, F. C., et al. (2010). The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 6, 871–878. doi: 10.4161/auto.6.7.13286
- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J. M., et al. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 19, 4577–4588. doi: 10.1093/emboj/19.17.4577
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., et al. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656–667. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.009
- Hama, H. (2010). Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 405–414. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.12.004
- Hattori, N., Shimura, H., Kubo, S., Kitada, T., Wang, M., Asakawa, S., et al. (2000). Autosomal recessive juvenile parkinsonism: a key to understanding nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease. *Neuropathology* 20(Suppl.), S85–S90. doi: 10.1046/j.1440-1789.2000.00312.x
- Hsu, P., and Shi, Y. (2016). Regulation of autophagy by mitochondrial phospholipids in health and diseases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 114–129. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.003
- Itier, J. M., Ibanez, P., Mena, M. A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G. A., et al. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2277–2291. doi: 10.1093/hmg/ddg239
- Ivatt, R. M., Sanchez-Martinez, A., Godena, V. K., Brown, S., Ziviani, E., and Whitworth, A. J. (2014). Genome-wide RNAi screen identifies the Parkinson disease GWAS risk locus SREBF1 as a regulator of mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8494–8499. doi: 10.1073/pnas.1321207111
- Ivatt, R. M., and Whitworth, A. J. (2014). SREBF1 links lipogenesis to mitophagy and sporadic Parkinson disease. *Autophagy* 10, 1476–1477. doi: 10.4161/auto.29642
- Kevala, J. H., and Kim, H. Y. (2001). Determination of substrate preference in phosphatidylserine decarboxylation by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 292, 130–138. doi: 10.1006/abio.2001.5076
- Kim, K. Y., Stevens, M. V., Akter, M. H., Rusk, S. E., Huang, R. J., Cohen, A., et al. (2011). Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells. *J. Clin. Invest.* 121, 3701–3712. doi: 10.1172/JCI44736
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., et al. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608. doi: 10.1038/33416
- Klein, C., and Schlossmacher, M. G. (2006). The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 136–146. doi: 10.1038/ncpneu0126
- Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *Faseb J.* 24, 3052–3065. doi: 10.1096/fj.09-144519
- Lee, H. J., Mayette, J., Rapoport, S. I., and Bazinet, R. P. (2006). Selective remodeling of cardiolipin fatty acids in the aged rat heart. *Lipids Health Dis.* 5:2. doi: 10.1186/1476-511X-5-2
- Lee, J. J., Sanchez-Martinez, A., Zarate, A. M., Beninca, C., Mayor, U., Clague, M. J., et al. (2017). Basal mitophagy is widespread in drosophila but minimally affected by loss of Pink1 or parkin. *J. Cell Biol.* 217, 1613–1622. doi: 10.1083/jcb.201801044
- Liebisch, G., Vizcaino, J. A., Köfeler, H., Trötz Müller, M., Griffiths, W. J., Schmitz, G., et al. (2013). Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 54, 1523–1530. doi: 10.1194/jlr.M033506
- Li, J., Romestaing, C., Han, X., Li, Y., Hao, X., Wu, Y., et al. (2010). Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell Metab.* 12, 154–165. doi: 10.1016/j.cmet.2010.07.003
- Lobasso, S., Tanzarella, P., Vergara, D., Maffia, M., Cocco, T., and Corcelli, A. (2017). Lipid profiling of parkin-mutant human skin fibroblasts. *J. Cell Physiol.* 232, 3540–3551. doi: 10.1002/jcp.25815
- Marcilla-Etxenike, A., Martin, M. L., Noguera-Salva, M. A., Garcia-Verdugo, J. M., Soriano-Navarro, M., Dey, I., et al. (2012). 2-Hydroxyoleic acid induces ER stress and autophagy in various human glioma cell lines. *PLoS One* 7:e48235. doi: 10.1371/journal.pone.0048235
- Marzella, L., Ahlberg, J., and Glaumann, H. (1982). Isolation of autophagic vacuoles from rat liver: morphological and biochemical characterization. *J. Cell Biol.* 93, 144–154. doi: 10.1083/jcb.93.1.144
- McWilliams, T. G., and Ganley, I. G. (2019). Investigating mitophagy and mitochondrial morphology in vivo using mito-QC: a comprehensive guide. *Methods Mol. Biol.* 1880, 621–642. doi: 10.1007/978-1-4939-8873-0\_41
- Menendez, J., Rodriguez-Navarro, J. A., Solano, R. M., Casarejos, M. J., Rodal, I., Guerrero, R., et al. (2006). Suppression of Parkin enhances nigrostriatal and motor neuron lesion in mice over-expressing human-mutated tau protein. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2045–2058. doi: 10.1093/hmg/ddl129
- Molino, D., Zemirli, N., Codogno, P., and Morel, E. (2016). The journey of the autophagosome through mammalian cell organelles and membranes. *J. Mol. Biol.* 429, 497–514. doi: 10.1016/j.jmb.2016.12.013
- Moore, D. J., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2003). Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromol. Med.* 4, 95–108. doi: 10.1385/NMM:4:1-2:95
- Morel, E., and Codogno, P. (2018). A novel regulator of autophagosome biogenesis and lipid droplet dynamics. *EMBO Rep.* 19:e46858. doi: 10.15252/embr.201846858
- Nakatogawa, H., Oh-oka, K., and Ohsumi, Y. (2008). Lipidation of Atg8: How is substrate specificity determined without a canonical E3 enzyme? *Autophagy* 4, 911–913. doi: 10.4161/auto.6646
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., and Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803. doi: 10.1083/jcb.200809125
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., and Youle, R. J. (2009). Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy* 5, 706–708. doi: 10.4161/auto.5.5.8505
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., et al. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8:e1000298. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298
- Oh-oka, K., Nakatogawa, H., and Ohsumi, Y. (2008). Physiological pH and acidic phospholipids contribute to substrate specificity in lipidation of Atg8. *J. Biol. Chem.* 283, 21847–21852. doi: 10.1074/jbc.M801836200
- Perucho, J., Casarejos, M. J., Rubio, I., Rodriguez-Navarro, J. A., Gomez, A., Ampuero, I., et al. (2010). The effects of parkin suppression on the behaviour, amyloid processing, and cell survival in APP mutant transgenic mice. *Exp. Neurol.* 221, 54–67. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.09.029
- Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., Verstreken, P., Zhou, Y., et al. (2004). Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development* 131, 2183–2194. doi: 10.1242/dev.01095
- Pickrell, A. M., Huang, C. H., Kennedy, S. R., Ordureau, A., Sideris, D. P., Hoekstra, J. G., et al. (2015). Endogenous parkin preserves dopaminergic substantia nigral neurons following mitochondrial DNA mutagenic stress. *Neuron* 87, 371–381. doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.034
- Pokorna, L., Cermakova, P., Horvath, A., Baile, M. G., Claypool, S. M., Griac, P., et al. (2015). Specific degradation of phosphatidylglycerol is necessary for proper mitochondrial morphology and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 34–45. doi: 10.1016/j.bbabio.2015.10.004
- Pollard, A. K., Ortori, C. A., Stoger, R., Barrett, D. A., and Chakrabarti, L. (2017). Mouse mitochondrial lipid composition is defined by age in brain and muscle. *Aging* 9, 986–998. doi: 10.18632/aging.101204
- Przedborski, S. (2017). The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 251–259. doi: 10.1038/nrn.2017.25
- Riekkinen, P., Rinne, U. K., Pelliniemi, T. T., and Sonninen, V. (1975). Interaction between dopamine and phospholipids. studies of the substantia nigra in

- Parkinson disease patients. *Arch. Neurol.* 32, 25–27. doi: 10.1001/archneur.1975.00490430047006
- Rodriguez-Navarro, J. A., Casarejos, M. J., Menendez, J., Solano, R. M., Rodal, I., Gomez, A., et al. (2007). Mortality, oxidative stress and tau accumulation during ageing in parkin null mice. *J. Neurochem.* 103, 98–114. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04762.x
- Rodriguez-Navarro, J. A., and Cuervo, A. M. (2010). Autophagy and lipids: tightening the knot. *Semin. Immunopathol.* 32, 343–353. doi: 10.1007/s00281-010-0219-7
- Rodriguez-Navarro, J. A., and Cuervo, A. M. (2012). Dietary lipids and aging compromise chaperone-mediated autophagy by similar mechanisms. *Autophagy* 8, 1152–1154. doi: 10.4161/auto.20649
- Rodriguez-Navarro, J. A., Kaushik, S., Koga, H., Dall'Armi, C., Shui, G., Wenk, M. R., et al. (2012). Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E705–E714. doi: 10.1073/pnas.1113036109
- Rojansky, R., Cha, M. Y., and Chan, D. C. (2016). Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *eLife* 5:e17896. doi: 10.7554/eLife.17896
- Ross, B. M., Mamalias, N., Moszczynska, A., Rajput, A. H., and Kish, S. J. (2001). Elevated activity of phospholipid biosynthetic enzymes in substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience* 102, 899–904. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00501-7
- Rubio, I., Rodriguez-Navarro, J. A., Tomas-Zapico, C., Ruiz, C., Casarejos, M. J., Perucho, J., et al. (2009). Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice. *Brain Res.* 1281, 91–100. doi: 10.1016/j.brainres.2009.05.039
- Ryan, T., Bamm, V. V., Stykel, M. G., Coackley, C. L., Humphries, K. M., Jamieson-Williams, R., et al. (2018). Cardiolipin exposure on the outer mitochondrial membrane modulates alpha-synuclein. *Nat. Commun.* 9:817. doi: 10.1038/s41467-018-03241-9
- Sentelle, R. D., Senkal, C. E., Jiang, W., Ponnusamy, S., Gencer, S., Selvam, S. P., et al. (2012). Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat. Chem. Biol.* 8, 831–838. doi: 10.1038/nchembio.1059
- Song, P., Li, S., Wu, H., Gao, R., Rao, G., Wang, D., et al. (2016). Parkin promotes proteasomal degradation of p62: implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Protein Cell* 7, 114–129. doi: 10.1007/s13238-015-0230-9
- Valadas, J. S., Esposito, G., Vandekerckhove, D., Miskiewicz, K., Deaulmerie, L., Raitano, S., et al. (2014). ER lipid defects in neuropeptidergic neurons impair sleep patterns in parkinson's disease. *Neuron* 98, 1155.e6–1169.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.022
- Xia, J., Psychogios, N., Young, N., and Wishart, D. S. (2009). MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res.* 37, W652–W660. doi: 10.1093/nar/gkp356
- Yang, D. S., Stavrides, P., Mohan, P. S., Kaushik, S., Kumar, A., Ohno, M., et al. (2015). Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* 134(Pt 1), 258–277. doi: 10.1093/brain/awq341
- Yoshii, S. R., Kishi, C., Ishihara, N., and Mizushima, N. (2011). Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 286, 19630–19640. doi: 10.1074/jbc.M110.209338
- Zhang, J., Xu, D., Nie, J., Han, R., Zhai, Y., and Shi, Y. (2014). Comparative gene identification-58 (CGI-58) promotes autophagy as a putative lysophosphatidylglycerol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 289, 33044–33053. doi: 10.1074/jbc.M114.573857

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Gaudioso, Garcia-Rozas, Casarejos, Pastor and Rodriguez-Navarro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.